

**Untersuchungen über die genetische
Funktion des farblosen Plastiden von
*Polytoma mirum***

von

Günther Scherbel

aus

Sulzbach-Rosenberg

1973 12 23 1



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Untersuchungen über die genetische Funktion des farblosen Plastiden von Polytoma mirum

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt

von

Günther Scherbel

aus

Sulzbach-Rosenberg

Als Dissertation genehmigt
von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung: 16.5.1973

Dekan:

Professor Dr. W. Heumann

1. Berichterstatter:

Professor Dr. C. G. Arnold

2. Berichterstatter:

Professor Dr. E. Haustein

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Verzeichnis der Abkürzungen	3
I. <u>Einleitung</u>	4
II. <u>Material und Methoden</u>	8
1. Charakterisierung der verwendeten Stämme	8
2. Nährmedien	8
3. Kulturbedingungen	11
4. Methoden	13
A. Zellzählung	13
B. Nachweis der Nitratreduktase	13
C. Ribosomenisolation	15
D. Nucleinsäurenextraktion und Gelelektrophorese	17
E. DNA-Extraktion und CsCl-Dichtegradientenzentrifugation	19
F. Mitochondrienisolation und Mitochondrien-DNA	22
5. Chemikalien	23
III. <u>Experimente und Ergebnisse</u>	24
A. Ernährungsphysiologische Charakterisierung von POLYTOMA MIRUM	24
1. Versuche mit organischen N-Quellen	24
2. Versuche mit anorganischen N-Quellen	27
3. Einfluß der organischen N-Quellen auf das pH der Nährlösung	31
4. Versuche zur Änderung der C-Quelle	32
5. Zusammenfassung	33
B. Ribosomenisolation bei CHLAMYDOMONAS REINHARDII, POLYTOMA MIRUM und ESCHERICHIA COLI	33
1. Entwicklung und Standardisierung der Methode	33
2. Ergebnisse der Ribosomenisolation unbehandelter Zellen	39
3. Einfluß von Rifampicin auf Wachstum und Ribosomensynthese	49
4. Einfluß der Mg^{2+} -Konzentration auf das Sedi- mentationsverhalten der Ribosomen	54
5. Zusammenfassung	58
C. Extraktion der Nucleinsäuren und elektrophoretische Auftrennung der ribosomalen RNA von CHLAMYDOMONAS REINHARDII und POLYTOMA MIRUM	60

1. Charakterisierung des RNA-Musters von CHLAMYDOMONAS REINHARDII	60
2. RNA-Untersuchungen bei unbehandelten sowie Rifampicin-inkubierten POLYTOMA-Zellen	63
3. Zusammenfassung	65
D. DNA-Extraktion und Charakterisierung durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation bei POLYTOMA MIRUM	66
1. DNA aus ganzen Zellen	66
2. Mitochondrienisolation und Extraktion der Mitochondrien-DNA	70
3. Zusammenfassung	73
E. Elektronenmikroskopische Untersuchung der pla- stidären Strukturkomponenten von POLYTOMA MIRUM, sowie Überprüfung der Funktion des genetischen Apparates	74
IV. <u>Diskussion</u>	81
V. <u>Zusammenfassung</u>	88
VI. <u>Literaturverzeichnis</u>	90

Verzeichnis der Abkürzungen

DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
DOC	Desoxycholat
EDTA	Äthylendiamin-tetraessigsäure
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid
FMN	Flavin-mononucleotid
g	Erdbeschleunigung
m-RNA	Messenger-Ribonucleinsäure
NAD(P) (H)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (-phosphat) bzw. deren reduzierte Form
OD ₂₆₀	optische Dichte bei 260 nm
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
r-RNA	ribosomale Ribonucleinsäure
S	Svedberg-Einheit (10^{-13} sec)
Saline-EDTA	0.15 M NaCl, 0.10 M EDTA, pH mit HCl eingestellt
SDS	Natrium-dodecylsulfat
SSC	0.15 M NaCl, 0.015 M Tri-natriumcitrat, pH mit HCl eingestellt
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
t-RNA	Transfer-Ribonucleinsäure
UpM	Umdrehung pro Minute

I. Einleitung

Die Synthese einfacher, organisch-biologischer Verbindungen aus anorganischen Stoffen ist mehrfach nachgewiesen (GARISSON et al. 1951, MILLER 1953, PATTEE 1965). In weiteren Modellexperimenten konnte gezeigt werden, daß aus Aminosäuren die Proteine, aus Zucker die Polysaccharide und aus Nukleotiden - über Nukleosidtriphosphate als Zwischenprodukte - die Nukleinsäuren entstehen (SCHRAMM et al. 1962). Auf der Basis dieser Ergebnisse und der Hypothese, daß die Entstehung des Lebens ein physikalisch-chemischer Prozeß ist, entwickelte KUHN (1972) ein Modell der erdgeschichtlichen Evolution. Danach ist die Selbstorganisation molekularer Systeme und die Evolution des genetischen Apparates eine Erscheinung, die unter geeigneten Bedingungen mit Notwendigkeit eintritt. KAPLAN (1968) kommt aufgrund Wahrscheinlichkeitsberechnungen zu dem Schluß, daß mit wiederholter Entstehung des Lebens gerechnet werden muß.

Nach OPARIN's Theorie (1957), die sich auf die Ergebnisse der vergleichenden Biochemie stützt, war die ursprüngliche Lebensform heterotroph. Im Laufe der Evolution entwickelten sich daraus die chemoautotrophen und phototrophen Organismen. Zwischen den ursprünglichen OPARIN'schen Lebensformen, von denen wir nur eine theoretische Vorstellung besitzen, und den heutigen heterotrophen Organismen bestehen keinerlei nachweisbaren Beziehungen (FOTT 1971). Vielleicht könnte man unter den Bakterien Abkömmlinge ursprünglicher heterotropher Formen suchen; direkte Beweise dafür sind jedoch nicht vorhanden. Die rezenten einfachen heterotrophen Organismen sind somit von den phototrophen abgeleitet. Die Entstehung farbloser Flagellaten aus farbigen kann sogar experimentell nachgewiesen werden (PROVASOLI et al. 1948, JIROVEC 1949). Ein Vertreter der farblosen Algen, die im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen sollen, ist die Gattung POLYTOMA.

Als EHRENBERG (1838) bei der von ihm benannten POLYTOMA UVELLA die Muttermembran um die Tochterzellen während der Teilungsstadien nicht sicher erkennen konnte, stellte er eine Verwandtschaft zwischen diesem farblosen Flagellaten und den Volvocales noch in Frage. COHN (1853) hatte bei seinen Untersuchungen diese Hülle gesehen und kam zu dem Schluß, daß mit Ausnahme

der Farblosigkeit und dem Vorkommen in faulendem Wasser in allen übrigen Merkmalen eine Übereinstimmung mit der Gattung *CHLAMYDOMONAS* vorliegt. Er bezeichnete deshalb *POLYTOMA* als *CHLAMYDOMONAS* *HYALINA* und zählte diesen chlorophyllfreien, bisher zu den Protozoen gerechneten Organismus zu der Algenklasse der Volvocales. Diese Anschauung fand in der damaligen Zeit keinen Anklang, und es war die Aufgabe weiterer Untersuchungen, diese tiefgreifenden Erkenntnisse zu bestätigen.

Mit den Nachweis der Stärke (COHN 1853, SCHNEIDER 1854, DANGEARD 1901, BRÉCHOT 1937) konnte ein weiteres pflanzliches

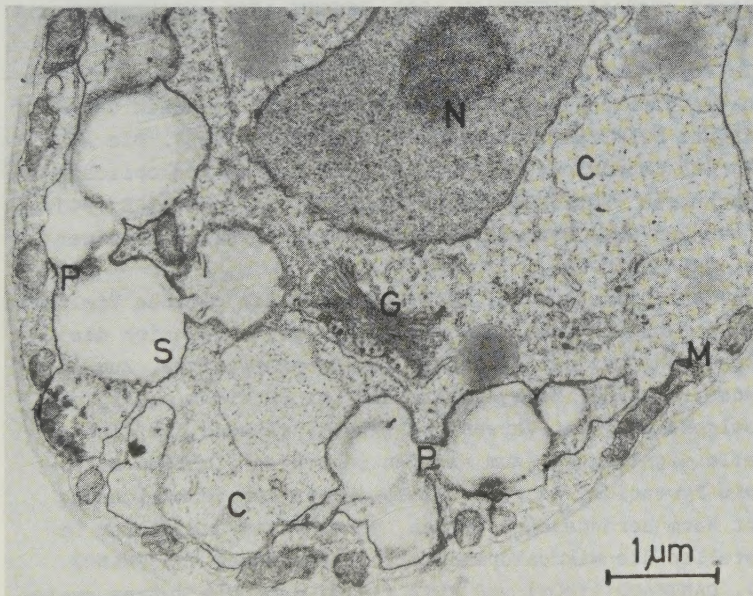


Abb. 1

Morphologischer Aufbau der *POLYTOMA*-Zelle

Die Elektronenmikrographie zeigt die amöboide Gestalt des Plastiden von *POLYTOMA MIRUM*. Charakteristisch ist das Fehlen des stabilisierenden Thylakoidsystems. Die Mitochondrien sind vornehmlich im peripheren Bereich der Zelle zu finden.

C = Cytoplasma, G = Golgi-Apparat, M = Mitochondrien, N = Nucleus, P = Plastid, S = Stärke, Glutaraldehyd/OsO₄-Fixierung.

Merkmal hinzugefügt werden. Zum anderen ließ die Anwesenheit von Stärke das Vorhandensein eines Plastiden vermuten. Auch das Auftreten von Karotinoiden (LINKS 1955, LINKS et al. 1960) spricht dafür. Diese Kriterien sind jedoch für das Vorhandensein eines Plastiden nicht beweisend, da sowohl die Stärke wie die Karotinoidbildung nicht an plastidäre Strukturen gebunden sein muß (PRINGSHEIM 1963). Erst elektronenmikroskopische Untersuchungen (JOYON 1962, LANG und COOK 1962) konnten die Anwesenheit eines Plastiden beweisen.

POLYTOMA ist also eine apochlorotische und keine apoplastidäre Parallelförmigkeit der Gattung CHLAMYDOMONAS. Die engen verwandtschaftlichen Beziehungen werden durch das Vorkommen von Sexualität ergänzt (STREHLOW 1929, MOEWUS 1935, PRINGSHEIM und ONDRACEK 1939).

In Bezug auf Zellkern, Geißeln, Zellwand und - soweit vorhanden - Augenfleck scheint kein Unterschied zwischen CHLAMYDOMONAS und POLYTOMA zu bestehen (PRINGSHEIM 1963). Die Ausbildung des Chondrioms dagegen ist nach den mikroskopischen Untersuchungen (VOLKONSKY 1930, HOLLANDE 1942, HOVASSE 1943, 1947) bei POLYTOMA besonders reich, wahrscheinlich massiger als bei CHLAMYDOMONAS.

Der Artenreichtum bei POLYTOMA zeigt die gleiche Vielfalt wie bei der grünen Parallelförmigkeit. Jedoch gestaltet sich die Unterscheidung bei den farblosen Formen schwieriger. Zum einen ändert sich die Zellgestalt, die bei POLYTOMA häufig als taxonomisches Merkmal Verwendung findet, während des Alterns der Zelle signifikant, zum anderen fehlen so wichtige Kriterien wie Pyrenoide. Auch der Plastid kann zur Kennzeichnung der Art kaum herangezogen werden. Vorarbeiten auf diesem Gebiet stellen die mikroskopischen Untersuchungen von FRANCÉ (1894), DANGEARD (1901) und ENTZ (1918) dar. Die genaue systematische Bearbeitung der Gattung POLYTOMA und den Versuch einer Gegenüberstellung einiger POLYTOMA- und CHLAMYDOMONAS-Arten war das Verdienst von PASCHER (1927, 1931).

Als extrakaryotische Erbträger besitzen sowohl die Mitochondrien (u. a. REICH und LUCK 1966; EDELMANN, EPSTEIN und SCHIFF 1966; NASS 1969) als auch die Plastiden (u. a. RIS und PLAUT 1962, GOODWIN 1966, KIRK und TILNEY-BASSET 1967) eine

spezifische Organellen-DNA. Zur Komplettierung ihres genetischen Apparates besitzen sie sogenannte 70 S-Ribosomen, die sich von den 80 S-Ribosomen des Cytoplasmas, auch bezüglich der Antibiotikaempfindlichkeit, unterscheiden (LYTTLETON 1962, BOARDMAN et al. 1966, SAGER und HAMILTON 1967, STUTZ und NOLL 1967).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die molekularbiologische Charakterisierung des farblosen Plastiden von *POLYTOMA MIRUM* im Vergleich zum Chloroplasten von *CHLAMYDOMONAS REINHARDII*. In diesem Zusammenhang soll auch die Frage geklärt werden, inwieweit dieser rudimentäre Plastid von *POLYTOMA MIRUM* noch eine genetische Funktion besitzt.

II. Material und Methoden

1. Charakterisierung der verwendeten Stämme

Für die Untersuchung wurden folgende Stämme verwendet:

CHLAMYDOMONAS REINHARDII C 137 als Wildtyp vom Paarungstyp +
POLYTOMA MIRUM (62-3)
ESCHERICHIA COLI K 12

Die einzellige heterothallische Grünalge CHLAMYDOMONAS REINHARDII wurde aus dem Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln-Vogelsang, bezogen und stammt letztlich aus dem Labor von Ruth SAGER. Wie alle Arten der Gattung CHLAMYDOMONAS ist sie phototroph, d. h. sie vermag alle für ihren Lebenszyklus erforderlichen Substanzen aus einem Medium zu synthetisieren, welches nur aus anorganischen Stoffen besteht. Darüber hinaus läßt sie sich sowohl phototroph wie heterotroph kultivieren. Im Dunkeln dient ein Acetatsalz als Kohlenstoffquelle.

Die einzellige, farblose und homothallische Alge POLYTOMA MIRUM wurde uns von der Algensammlung des Pflanzenphysiologischen Instituts Göttingen zur Verfügung gestellt. PRINGSHEIM (1954) fand diesen Flagellaten in einem Moorgraben im Solling bei Göttingen. Ernährungsphysiologisch weicht POLYTOMA MIRUM insofern von den übrigen Vertretern dieser Gattung ab, als sie nicht Acetat, sondern Glucose als C-Quelle benutzt und nur in schwach sauren Lösungen gedeiht. Die Kultivierung ist auf die heterotrophe Ernährungsweise beschränkt.

ESCHERICHIA COLI erhielten wir von dem Institut für Mikrobiologie in Erlangen.

2. Nährmedien

Zur Herstellung der Nährmedien wurde stets demineralisiertes Wasser verwendet. Für die Bereitung von Nährböden wurde dem Medium 2 % Agar zugesetzt. Als Agar wurde ausschließlich Difco-Bacto-Agar verwendet. Die Nährmedien wurden zur Sterilisation 20 Minuten bei 120°C autoklaviert.

a) CHLAMYDOMONAS REINHARDII

Die Zusammensetzung der zur Anzucht dienenden Nährmedien entsprach weitgehend den von LEVINE und EBERSOLD (1958), EVERSOLE (1956) und GOWANS (1957) angegebenen Werten.

Für Dunkelversuche wurde dem Medium außerdem als Kohlenstoffquelle 0,2 % Natriumacetat zugesetzt und anschließend mitsterilisiert. Der verwendete Puffer war auf einen pH-Wert von 6,8 eingestellt.

Phosphatpuffer:

nach LEVINE und EBERSOLD (1958)

K_2HPO_4	7.17 g
KH_2PO_4	3.63 g
Aqua bidest.	1000 ml

Spurenelementlösung:

nach HUTNER et al. (1950)

EDTA	5.00 g	
$ZnSO_4 \times 7 H_2O$	2.20 g	
H_3BO_3	1.14 g	
$MnCl_2 \times 4 H_2O$	0.51 g	
$FeSO_4 \times 7 H_2O$	0.49 g	
$CoCl_2 \times 6 H_2O$	0.16 g	
$CuSO_4 \times 5 H_2O$	0.16 g	
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4 H_2O$	0.11 g	bzw.
$(NH_4)_2MoO_4 \times 4 H_2O$	0.11 g	
Aqua bidest.	100 ml	

BEIJERINCK-Lösung

Die BEIJERINCK-Lösung von BOLD (1942) wurde so modifiziert, daß sie eine 5-fache Menge an NH_4NO_3 enthielt (nach RANNEBERG 1968). Andere Autoren variieren den Wert um das Dreifache (GOWANS 1957) oder sogar zehnfach (EVERSOLE 1956). Unsere BEIJERINCK-Lösung setzte sich wie folgt zusammen:

NH_4NO_3	2.50 g
K_2HPO_4	0.20 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0.20 g
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0.10 g
Aqua bidest.	1000 ml

Minimal-Medium:

nach LEVINE und EBERSOLD (1958)

BEIJERINCK-Lösung	100 ml
Phosphatpuffer	100 ml
Spurenelementlösung	1 ml
Aqua bidest.	800 ml

b) POLYTOMA MIRUM

Da bei diesem Organismus die Ernährungsphysiologie noch nicht untersucht war, kultivierten wir anfänglich diesen Stamm in dem von KOCH (Pflanzenphysiol. Institut. Göttingen, pers. Mitteilung) vorgeschlagenen Vollmedium.

Der für das Minimalmedium verwendete Phosphatpuffer hatte einen pH-Wert von 6.6.

Phosphatpuffer:

K_2HPO_4	4.32 g
KH_2PO_4	5.70 g
Aqua bidest.	1000 ml

Minimalmedium:

Glucose	2.00 g
NH_4NO_3	0.50 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0.10 g
Phosphatpuffer	100 ml
Spurenelementlösung	1 ml
Aqua bidest.	900 ml

Vollmedium:

nach KOCH

Glucose	2.00 g
Bacto-Tryptone	1.00 g
Hefeextract	1.00 g
Aqua bidest.	1000 ml

c) ESCHERICHIA COLI

Zur Kultivierung der Bakterien verwendeten wir ausschließlich das Bacto-Antibiotic-Medium 3 (DIFCO).

3. Kulturbedingungen

Stammkulturen

Die Algenstämme wurden zur Aufbewahrung auf Schrägagarröhrchen geimpft und in einen Konstantraum gebracht. Dieser war auf einen abwechselnden Hell-Dunkel-Rhythmus von jeweils 12 Stunden eingestellt. Die Stämme wuchsen hier bei einer gleichbleibenden Temperatur von 16°C und bei einer Lichtstärke von etwa 800 Lux. Unter diesen Bedingungen konnten die Kulturen ca. 4 - 8 Wochen unverändert aufbewahrt werden, bevor man sie auf ein frisches Medium überimpfte.

ESCHERICHIA COLI wurde auf Agarplatten geimpft, ca. 1 - 2 Stunden im Brutschrank bei 37°C kultiviert und dann im Kühlschrank bei 6°C aufbewahrt.

Anzucht der Stämme

Für die Experimente wurden immer Stämme verwendet, die sich in der mittleren bis späten Log-Phase befanden. Die Dauer dieser Log-Phase ist abhängig von den einzelnen Stämmen und den herrschenden Versuchsbedingungen, so daß sie jeweils neu ermittelt werden muß. Für die begasten Flüssigkulturen von CHLAMYDOMONAS und POLYTOMA beträgt sie etwa 3 Tage.

Waren Kulturen über einen längeren Zeitraum im Konstantraum gewachsen, so schalteten wir zwei Passagen auf Minimalmedium im Klimaraum bis zu den eigentlichen Experimenten ein, um das Wachstum aller Zellen einheitlich anzuregen, und so vergleichbare Ausgangskulturen zu erhalten.

CHLAMYDOMONAS

Die Anzucht erfolgte in einem Klimaraum bei 25°C und einer Dauerbeleuchtung von etwa 5500 Lux durch abwechselnd geschaltete Weißlicht- und Warmtonröhren (SOROKIN und KRAUSS 1958). Die Flüssigkulturen wurden mit einer Mischung von Luft und 2 % CO₂ begast. Die Kultivierung in Minimalmedium unter diesen Bedingungen bezeichnet man als phototroph, während unter sonst gleichen Voraussetzungen der Zusatz von Natriumacetat die mixotrophe Kultivierung darstellt.

Für die heterotrophe Anzucht stand ein Dunkelthermostat zur Verfügung, der auf 25°C eingestellt war.

POLYTOMA

Für die Wachstumsversuche wurde die Kultur in 250 ml Fernbachkolben gezogen, die mit 100 ml Nährmedium gefüllt waren. Da starke Lichteinwirkung, die für die grünen Algen optimales Gedeihen gewährleistet, bei POLYTOMA eine wachstumshemmende Wirkung hat, wurde im Dunkelthermostat bei 25°C kultiviert (LINKS et al. 1960). Zur Verbesserung des Gasaustausches wurden die obligat aerob wachsenden Kulturen einmal täglich geschüttelt. Für einige Versuche wurden Massenkulturen benötigt. Stehkolben mit 6 Liter Inhalt waren mit 5 L Nährmedium gefüllt und wurden mit Luft begast. Kleinere Mengen an Flüssigkulturen kultivierten wir in Anzuchtkolben.

Zur notwendigen Abdunkelung der Kulturen vom übrigen Klimaraum diente ein schwarzer Vorhang als Abtrennung.

ESCHERICHIA COLI

Die Bakterien wurden bei 37°C (Wasserbad) im Anzuchtkolben mit Luft begast. Die Wachstumsdauer betrug nicht mehr als 8 Stunden.

Bei allen Experimenten wurde nach denselben Methoden gearbeitet. Spätestens nach 25 Tagen galt ein Versuch als beendet und wurde ausgewertet.

4. Methoden

A. Zellzählung

Zelldichtebestimmungen nahmen wir mit einem Autocytometer der Firma Fisher, Scientific Company, USA, vor. Dieses Gerät ermöglichte es uns, die Algen mit geringem zeitlichen Aufwand zu zählen. Kontrollversuche, die zur Eichung des Autocytometers gemacht worden waren, ergaben, daß die gemessenen Werte in der Regel um 10 % über der Lebendzellzahl lagen, die sich aus parallel durchgeführten Versuchen auf Agarplatten ermitteln ließ. Diese Differenz lag einmal in dem systematischen Fehler des Gerätes und zum anderen in dem geringen Prozentsatz von Zellen, die nicht überlebten. Da die Fehlerrate aber konstant blieb, lieferte das Gerät reproduzierbare Werte, wenn man folgende Arbeitsweise beibehielt: Die zu messende Suspension mußte auf eine geringere Konzentration verdünnt werden, da der Zählbereich auf 23000 Teilchen/ml beschränkt ist. Weiter war es wichtig, schnell zu arbeiten, da sich durch die starke Eigenbeweglichkeit der Algen in den Meßröhren sehr rasch eine Konzentrationsverschiebung einstellte, indem sich die Zellen am Flüssigkeitsminikus ansammelten. Aus diesem Grunde wurde vor jedem Verdünnungsschritt und jedem Zählgang die Suspension kräftig mit einem Mixomat (BOSKAMP Gerätebau KG, Kassel) aufgeschüttelt und sofort weiterverarbeitet. Es konnten drei Zählungen eines Meßröhrchens nacheinander durchgeführt werden; dabei waren die Schwankungen noch gering und der Mittelwert diente zur Berechnung der Ausgangskonzentrationen.

Da das Gerät nur die Zahl der Teilchen ermittelt und nicht auf Größe, Farbe oder Art der Partikel anspricht, mußte natürlich gewährleistet sein, daß auch tatsächlich nur Einzelzellen und keine Zellaggregate und möglichst wenig Verunreinigungen in der Lösung vorlagen. Vom Anzeigewert mußte außerdem der Blindwert des Verdünnungsmediums (Aqua bidest. oder Puffer) abgezogen werden.

B. Nachweis der Nitratreduktase

Für die Nitratreduktase wurden die von PANEQUE et al. (1965, 1966) beschriebenen Standardtests herangezogen. Die Reaktion wurde in 10 ml Probegläschen unter Luft bei 30°C durchgeführt.

Zellaufschluß und Enzymgewinnung

Die frisch geerntete Kultur wurde mit der dreifachen Gewichtsmenge Alcoa Alumina 305 im vorgekühlten Mörser solange verrieben, bis im Mikroskop nur noch wenige intakte Zellen nachweisbar waren. Nach Zugabe von 20 ml Aufschlußpuffer (Tris-HCl 0.01 M, $\text{FAD } 10^{-5} \text{ M}$; $\text{pH} = 7.5$) wurde die Masse zu einem homogenen Brei vermischt. Durch Zentrifugation bei $30000 \times g$ (30 Min., 4°C ; WKF-G 50 K Kühlzentrifuge) sedimentierten die groben Zellbestandteile. Der Überstand wurde für die enzymatischen Tests auf Nitratreduktase verwendet.

STANDARDTEST mit NADH_2 als Elektronendonator

Ein Gesamtvolumen von 1 ml enthielt 10 Mikromole KNO_3 , 100 Mikromole Tris/HCl-Puffer, $\text{pH } 7.5$, 0.3 Mikromole NADH und eine ausreichende Enzymmenge, um einen Umsatz von 40 - 60 Mikromole Nitrat hervorzurufen. Nach zehnminütiger Inkubationszeit wurde die Reaktion gestoppt, indem überschüssiges NADH_2 durch starkes Schütteln auf dem Mixomat mit Luftsauerstoff oxydiert wurde. Dann fügte man 1 ml Sulfanilamid-Lösung zu (5 g in 100 ml HCl 32 % gelöst und mit 400 ml Aqua demin. verdünnt). Die ausgefallenen Proteine wurden bei 4000 UpM, 5 Min. (Christ-Tischzentrifuge) abzentrifugiert. Durch Zugabe von 1 ml N-[Naphtyl-(1)]-äthylen-diammonium-dichlorid-Lösung (100 mg/500 ml) und Verdünnen mit 2 ml H_2O zeigte sich nach 10 Min. eine Rotfärbung, die auf Bildung eines Diazofarbstoffes zurückzuführen ist. Diese Lösung wurde mit einem Spektralphotometer (Zeiss PMQ II) bei 540 nm gemessen und die gebildete Nitritmenge anhand einer Eichkurve ermittelt.

STANDARDTEST mit FMN als Elektronendonator

Ein Gesamtvolumen von 1 ml enthielt jeweils 10 Mikromole KNO_3 , 100 Mikromole Tris/HCl-Puffer, $\text{pH } 7.5$, 0.2 Mikromole FMN, 0.8 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ in 0.1 ml 95 mM NaHCO_3 -Lösung und ein Enzymaliquot wie oben definiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch starkes Schütteln auf dem Mixomat gestoppt, bis das verbliebene Dithionit durch den Luftsaurestoff oxydiert worden war. Der Nitritnachweis erfolgte wie oben.

Eine Einheit der Nitratreduktase entspricht jener Enzymmenge, die unter Standardbedingungen in einer Minute 1 Mikromol Nitrat zu Nitrit reduziert.

C. Ribosomenisolation

Zur Isolierung und Charakterisierung der Ribosomen entwickelten wir ein Verfahren, das die Aufschlußmethode von HOOBER und BLOBEL (1969) mit der fraktionierenden Zentrifugationstechnik von GALLING (1968) kombiniert.

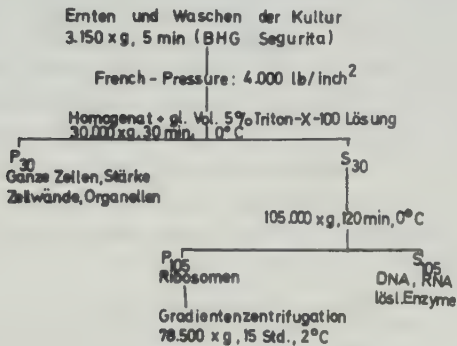


Abb. 2

Schema der Ribosomenisolation

Nach dem Zellaufschluß mit der French-Pressure werden die Ribosomen aus dem Homogenat durch fraktionierende Zentrifugation isoliert.

Die im Folgenden angegebenen Gradienten- und fraktionierenden Zentrifugationen wurden auf der Spinco-Ultrazentrifuge L2-50B (Beckman Instruments, München) durchgeführt. Die g-Zahlen beziehen sich auf den mittleren Radius des Rotors. Für spektralphotometrische Messungen wurde ein PMQ II

(Zeiss) verwendet, bei dem der rechte Drehschalter am Anzeigergerät auf zehnfache Verstärkung gestellt war.

Bei den Untersuchungen gingen wir stets von frisch geernteten Kulturen aus, die zweimal mit Isolationsmedium (25 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 25 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.5) gewaschen wurden. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden bei 0° - 4°C durchgeführt. Das Pellet resuspendiert man so, daß eine Zelldichte von 2 - 5 x 10⁸ Zellen/ml erreicht wird; jedoch darf das Mindestvolumen von 5 ml nicht unterschritten werden. Die Suspension wird in eine French-Pressure-Zelle (American Instruments Co., Silver Springs) gegeben und bei einem Druck von 4000 lb/inch² aufgeschlossen. Wie die mikroskopische Kontrolle zeigt, sind sowohl die Zellen wie die Chloroplasten zerstört. Das Homogenat versetzt man mit dem gleichen Volumen Isolationsmedium, welches 5 % Triton-X-100 enthält. Nach 10- bis 15-minütiger Einwirkungsdauer des Detergenz zentrifugiert man mit dem Rotor 50 Ti bei 30000 x g, 30 Min., 0°C ab (Abb. 2). Das Sediment P₃₀ besteht vorwiegend aus unzertrümmerten Zellen, Zellwandtrümmern, Organellenbruchstücken und Membransystemen. Die Zellkerne werden beim Aufschluß zerschlagen.

Der Überstand S₃₀ wird zur Abtrennung der Ribosomen im gleichen Rotor 120 Min. bei 105000 x g, 0°C zentrifugiert (Abb. 2). Die Fraktion P₁₀₅ enthält die ribosomalen Partikel sowie plastidäre Verunreinigungen, die das an sich farblose, gelatineartige Ribosomen-Pellet mehr oder minder stark grün färben. Der Überstand S₁₀₅, der subribosomale Partikel, DNA, t-RNA und lösliche Proteine enthält, wird verworfen.

Die Fraktion P₁₀₅ wird in wenig Isolationsmedium resuspendiert. Die Menge an Puffer ist abhängig von dem Stamm, den Kulturbedingungen und der Kulturmenge. Unter optimalen Wachstumsbedingungen ist folgender Richtwert gültig: Pro 100 ml Kultur kann man 0.8 - 1.0 ml Isolationsmedium zum Resuspendieren des Ribosomen-Pellets verwenden.

In manchen Fällen wurde die Ribosomensuspension durch Zentrifugation bei 20000 x g, 20 Min., 0°C von Verunreinigung befreit.

Die Ribosomenmenge wurde anhand der UV-Absorption bei 260 nm erfaßt. In der Quarzküvette (1 cm Schichttiefe) wurden 2 ml Isolationsmedium vorgelegt und 10 oder 20 µl Ribosomensuspension zugefügt. Dies entspricht einem Verdünnungsschritt von 1 : 200 bzw. 1 : 100. Von der Extinktion dieser Lösung bei 260 nm wurde als Maß für Verunreinigungen die Extinktion bei 310 nm subtrahiert. Durch Multiplikation dieser Differenz mit dem Verdünnungsfaktor erhält man die OD_{260} der Ribosomensuspension. 40 µg/ml RNA haben dann eine Extinktion von 1 (BEAVEN et al. 1955); 1 mg/ml Ribosomen entspricht 17.5 OD_{260} -Einheiten. Bei diesem letzten Wert wurde zugrundegelegt, daß cytoplasmatische Eukaryontenribosomen zu etwa 50 % aus Protein und 50 % aus RNA bestehen (GRUMMT und BIELKA 1970).

Zur Auftrennung der ribosomalen Präparate dienten linear ansteigende Konzentrationsgradienten von Saccharose (BRITTEN und ROBERTS 1960). Die Gradienten wurden durch Mischen von 10 %-iger und 30 %-iger Saccharoselösung (Isolationsmedium als Lösungsmittel) mittels eines Gradientenmischers (Firma Hölzel) hergestellt und mit 3 - 6 OD_{260} der Ribosomensuspension beladen. Nach der Zentrifugation im Rotor SW 27.1 (75000 x g, 15 Std., 2°C) wurden sie geerntet, indem die Saccharoselösung mit einer Perpex-Pumpe (LKB 10200 Colora) aus den Zylulosenitratröhrchen gepumpt wurde. Die Extinktion der Lösung konnte mit einer Durchflußküvette (176 QS, 1 cm Schichttiefe, Firma Helma) im Spektralphotometer bei 260 nm kontinuierlich gemessen werden. Über den angeschlossenen Transmissions-Emissionswandler wurden die Meßwerte von einem Schreiber (Honeywell Controls Ltd., G.B.) unmittelbar registriert.

Abweichende Isolierungsbedingungen sind bei den entsprechenden Versuchen angegeben.

D. Nucleinsäurenextraktion und Gelelektrophorese

a) Isolierung von Nucleinsäuren

Zur Präparation nativer Nucleinsäuren (RICHTER und SENGER 1964) wurde die frisch geerntete Kultur mit Isolationsmedium (siehe Seite 15) gewaschen. Die Algen wurden in Puffer resuspendiert und mit der French-Pressure bei 4000 lb/inch²

aufgeschlossen. Das Homogenat versetzte man mit 30 ml KIRBY (1965)-Medium (modifiziert: Isolationsmedium 100 ml, NaCl 1 %, Phenol-Kresol Mischung 6 %, Tri-isopropyl-naphthalinsulfonsäure-Na 1 %) und 30 ml Phenol-Kresol Mischung (wassergesättigtes Phenol 100 ml, Kresol 14 ml). Während der 15 Minuten Einwirkungszeit wurde die Suspension gut gerührt. Nach dem Abzentrifugieren bei 3150 x g, 10 Min. (BHG Segurita) wurde die Phenol-Phase verworfen und die wäßrige Phase nochmals mit 30 ml Phenol-Kresol versetzt. Durch erneutes Zentrifugieren wurden die flüssigen Phasen getrennt und der wäßrige Überstand abpipettiert. Zur Nachextraktion der Phenol-Phase wurden 30 ml Isolationsmedium zugesetzt, abzentrifugiert und die wäßrige Fraktion abgetrennt. Die wäßrigen Überstände wurden vereinigt und daraus die Nucleinsäuren mit dem dreifachen Volumen an Äthanol (96 %) in der Tiefkühltruhe ausgefällt. Nach ca. 2 - 4 Std. wurden die gefällten Nucleinsäuren abzentrifugiert, zweimal mit Äthanol (96 %) gewaschen und über Nacht im Vakuum getrocknet.

b) Präparation der Gele

Hochmolekulare Nucleinsäuren trennt man am besten in einem 2.4 %-igen Gel auf (LOENING 1967, BOURQUE et al. 1971). Dazu gibt man zusammen: 5 ml Acrylamidlösung (Acrylamid 15 g, Methylenbisacrylamid 0.75 g, Aqua dest. 100 ml), Puffer 6.25 ml (Tris 21.7 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 23.4 g, $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 1.85 g, Aqua dest. 1 l), Aqua dest. 19.7 ml und als Polymerisationskatalysator 25 μl TMED (N, N, N', N'-Tetramethyläthylen-diamin) sowie 0.25 ml Ammoniumpersulfatlösung 10 %. Hiermit wurden die Plastikröhrchen (4 mm $\varnothing$) bis zu 8 cm Länge gefüllt und mit Aqua dest. überschichtet, um eine glatte Geloberfläche zu erhalten. Die Gele polymerisierten innerhalb von ca. 40 Min. unter einer Leuchtstoffröhre.

c) Beschicken der Gele

Ein Gel wird mit ca. 1 OD_{260} -Einheit an Nucleinsäuren beschickt, aber nicht mehr als 60 μl . Vor dem Auftragen der Nucleinsäuren wurden die Gelröhrchen mit Laufpuffer (siehe d) aufgefüllt und den Nucleinsäurelösungen 5 - 6 % RNase-freie

Saccharose zugesetzt, um scharfe Bande zu erhalten. Weiter wurde ein Tropfen Bromphenolblau zugefügt, um den Verlauf der Elektrophorese zu verfolgen.

d) Elektrophorese

Die Röhrchen wurden in ein zweiteiliges Puffergefäß eingespannt, dessen beide Teile mit Laufpuffer (Puffer aus b auf 1/5 verdünnt unter Zusatz von 2 g/l SDS) gefüllt wurden. Beim Anlegen einer Spannung wandern die Nucleinsäuren zur Kathode. Die Spannung ist so bemessen, daß zunächst 30 Min. lang 2 mA/Gel, dann 2 1/4 Std. 4 mA/Gel an Strom fließen. Die Zeit ist so gewählt, daß die t-RNA die Gele bereits verlassen hat, aber eine besonders gute Auftrennung der einzelnen r-RNA-Typen erzielt wurde.

e) Auswertung der Gele

Die Gele wurden aus dem Plastikröhrchen befreit und anschließend angefärbt. Dazu wurden sie 15 Min. mit Aqua dest. gewaschen, 15 Min. mit 1 M Essigsäure fixiert und anschließend 2 Std. mit einer Lösung von 0.2 % Methylenblau in Acetatpuffer gefärbt. Die überschüssige Farbe wurde durch 1 1/2-tägiges Waschen in mehrfach gewechselten Aqua dest. entfernt, so daß am Ende nur noch die Nucleinsäuren als blaue Banden gefärbt waren. Die Auswertung erfolgte mit einem Chromoscan (Firma Joyce und Loeb), der die Absorption längs des Gels aufzeichnet.

E. DNA-Extraktion und CsCl-Dichtegradientenzentrifugation

a) Isolierung der DNA

Zur Gewinnung der DNA aus ganzen Zellen wurden die Methoden von MARMUR (1961) sowie CHIANG und SUEOKA (1967) modifiziert.

MARMUR-Methode:

Die Kultur wurde zweimal mit Saline-EDTA (0.15 M NaCl, 0.10 M EDTA, pH 8.8) gewaschen und im doppelten Volumen des Puffers resuspendiert. 1 % DOC und 1 % SDS werden als Detergenzien zugesetzt. Nach 10 Min. Inkubation im Wasserbad bei 37°C wird ein

gleiches Volumen an Chloroform/Oktanoll (6 : 1) zur Extraktion der Pigmente zugefügt. Durch Zentrifugieren bei 15000 x g, 10 Min. kommt es zur Phasentrennung. Aus dem wäßrigen Überstand, der DNA, RNA sowie lösliche Proteine enthält, werden die Nucleasen mit Phenol in SSC (0.15 M NaCl, 0.015 M Tri-natrium citrat, pH 7.0) extrahiert. Nach der Zentrifugation (10000 x g, 20 Min.) dialysiert man die wäßrige Phase über Nacht bei 2°C gegen SSC. Zum Abbau der RNA inkubiert man bei 37°C, 20 Min. mit 50 µg/ml DNase-freier RNase A (EC 2.7.7.16). Überschüssiges Enzym sowie restliche Proteine werden durch erneute Phenolbehandlung entfernt und die wäßrige Phase gegen 0.2 SSC dialysiert.

CHIANG-SUEOKA-Methode:

Die mit Saline-EDTA gewaschenen Algen werden im doppelten Volumen einer 27 %-igen Saccharose-Lösung (Saline-EDTA, pH 8.8 als Lösungsmittel) resuspendiert. Zum Lysieren wird ein Detergenzgemisch aus 1 % DOC, 2 % SDS, 2 % Na-Sarcosinat und 5 % Triton-X-100 zugesetzt. Nach 10 Min. Inkubation im Wasserbad bei 37°C werden die Nucleinsäuren zweimal mit 96 %-igem Äthanol (- 20°C) gefällt. Die abzentrifugierten Nucleinsäuren werden in SSC aufgenommen und zum Abbau der RNA mit 25 µg/ml DNase-freier RNase A (EC 2.7.7.16) sowie 20 Einheiten/ml DNase-freier RNase T₁ (EC 2.7.7.26) zweimal 30 Min. bei 37°C inkubiert. Die Enzyme werden durch Einwirkung von 100 µg/ml DNase-freie Pronase inaktiviert (HOTTA und BASSEL 1965). Nach dem Abzentrifugieren (20000 x g, 20 Min.) wird der Überstand zuerst 3 Std. bei 37°C gegen SSC, dann über Nacht bei 2°C gegen 0.2 SSC dialysiert.

Die quantitative Bestimmung der isolierten DNA erfolgt über die Hyperchromizität. Danach entspricht eine Erhöhung der Extinktion (260 nm) bei 25°C von 1.0 auf 1.4 bei 100°C einer Konzentration von 50 µg/DNA/ml.

b) Analytische CsCl-Dichtegradientenzentrifugation

DNA-CsCl-Mischungen in 0.2 SSC werden refraktrometrisch auf eine Dichte von 1.706 (g/cm³) eingestellt. Als Referenz dient *Micrococcus luteus* DNA. Die Beladung pro Zelle beträgt 1.0 - 1.5 µg DNA. Die Zentrifugation wird bei 44000 UpM, 20 Std., 20°C (AN-F Titanrotor, Beckman) mit einer analytischen Ultrazentrifuge (Spinco model E) durchgeführt. In dem durch Rotation erzeugten Schwerfeld kommt es zur Ausbildung eines Dichtegra-

dienten, der sich aufgrund des erreichten Sedimentations-Diffusionsgleichgewichtes einstellt. Die Auftrennung der einzelnen DNA-Komponenten erfolgt aufgrund ihrer verschiedenen Dichten, indem sich die DNA-Moleküle innerhalb des Gradienten in den Bereichen ihrer Schwebedichte anreichern. Die Verteilung dieser DNA-Banden wird während der Zentrifugation mit dem photoelektrischen Scanner bestimmt und von einem Schreiber registriert. Der aufgezeichnete Kurvenverlauf wird als Scan bezeichnet.

c) Auswertung der analytischen Ultrazentrifugenscans

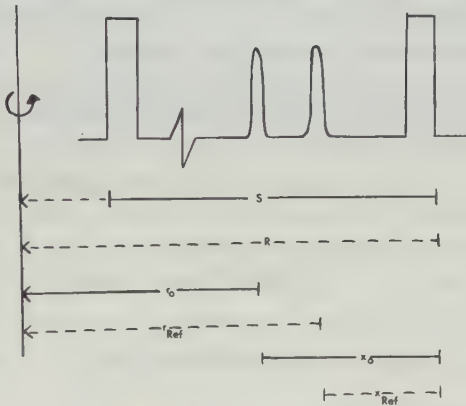


Abb. 3

Schematische Darstellung eines Ultrazentrifugenscans

Der analytische Ultrazentrifugenscan wird nach photoelektrischer Registrierung mit dem UV-Scanner und Aufzeichnung durch den Schreiber erhalten. Er zeigt die Auftrennung der einzelnen DNA-Komponenten. Die Dichte der Test-DNA (ρ_0) errechnet sich aus den Abständen ihrer Bande (r_0) sowie der Referenz-DNA-Bande (r_{Ref}) vom Rotorzentrum unter gleichzeitiger Einbeziehung der Dichte der Referenz-DNA (ρ_{Ref}).

- | | |
|---|--|
| s = Länge der Zelle (1.6 cm) | x_{Ref} = Abstand der Referenz-Bande vom Scan-Anfang |
| R = Abstand des Zellenanfangs vom Rotorzentrum (7.3 cm) | ρ_0 = Dichte der Test-DNA |
| r_0 = Abstand der Bande der Test-DNA vom Rotorzentrum | ρ_{Ref} = Dichte der Referenz-DNA |
| r_{Ref} = Abstand der Bande der Referenz-DNA vom Rotorzentrum | M = 0.0089082 bei 44000 UpM |
| x_0 = Abstand der Testbande vom Scan-Anfang | GC = Mol-% Guanin und Cytosin |

Nach der Methode von SCHILDKRAUT, MARMUR und DOTY (1962) läßt sich anhand des Ultrazentrifugenscans die Dichte einer DNA sowie ihr GC-Verhältnis berechnen. Die Auswertung erfolgt im einzelnen folgendermaßen:

Unter Berücksichtigung des Vergrößerungsfaktors (F) werden zunächst r_{Ref} und r_o berechnet:

$$F = \frac{\text{Länge des Scans}}{S}$$

$$r_{Ref} = R - \frac{x_{Ref}}{F}$$

$$r_o = R - \frac{x_o}{F}$$

Die Dichte der Test-DNA (ρ_o) sowie ihr GC-Verhältnis ergeben sich aus folgenden Gleichungen:

$$\rho_o = \rho_{Ref} + M (r_o^2 - r_{Ref}^2) \text{ [g/cm}^3\text{]}$$

$$GC = \frac{\rho_o - 1.660}{0.098}$$

F. Mitochondrienisolation und Mitochondrien-DNA

a) Isolierung der Mitochondrien

Da der Anteil an Mitochondrien-DNA pro Zelle sehr gering ist (ARNOLD 1971), und die komplizierte morphologische Struktur der Mitochondrien (ARNOLD et al. 1972, SCHÖTZ et al. 1972) die Isolierung und Anreicherung erschwert, war die Anzucht von Massenkulturen (35 - 60 l) erforderlich. Die Algen wurden mit einer Durchlaufzentrifuge (Christ-Junior) geerntet, zweimal mit Puffer (0.25 M Saccharose, 1 mM EDTA, 0.01 M Tris/HCl, pH 7.3) gewaschen und im Verhältnis 1 : 3 darin suspendiert (LLOYD et al. 1968). Alle weiteren Isolationsschritte wurden bei 0° - 4°C durchgeführt. Der Zellaufschluß erfolgte mit der French-Pressure bei 1000 lb/inch² (KRAWIEC und EISENSTADT 1970). Zur Klärung des Homogenats wurde bei 500 x g, 10 Min., 0°C (Rotor 42, L2-50B, Beckman) zentrifugiert und das Pellet verworfen. Eine weitere Fraktionierung wurde im gleichen Rotor bei 1000 x g, 10 Min., 0°C durchgeführt. Die Mitochondrien konnten aus diesem Überstand bei 5000 x g, 20 Min., 0°C sedimentiert werden.

b) Gewinnung der Mitochondrien-DNA

Kontaminierende Kern-DNA wurde durch Enzymbehandlung abgebaut. Die Mitochondrienfraktion resuspendierte man in gleichem Volumen Puffer (unter Zusatz von 6 mM $MgCl_2$) und inkubierte mit 100 $\mu g/ml$ DNase (EC 3.1.4.5) 30 Min. im Eisbad (SUYAMA und BONNER 1966). Danach wurden zur Inaktivierung der DNase die Mitochondrien sedimentiert (5000 x g, 20 Min., 0°C), das Pellet sofort im gleichen Volumen doppelt-konzentrierten Saline-EDTA (siehe Seite 18) resuspendiert und mit 1/3 Volumen 30 %-iger, alkoholischer SDS-Lösung versetzt. Die Pigmente extrahierte man mit Chloroform-Oktanol (6 : 1). Nach der Zentrifugation 9000 x g, 10 Min., 0°C) wurden aus dem wäßrigen Überstand die Nucleasen mit Phenol in Saline-EDTA entfernt. Die abgetrennte Phenol-Phase (20000 x g, 20 Min., 0°C) wurde verworfen, die wäßrige Fraktion gegen SSC über Nacht bei 4°C dialysiert. Die Lösung wurde dann mit 50 $\mu g/ml$ DNase-freier RNase A (EC 2.7.7.16) nach MARMUR (1961) bei 37°C, 20 Min. behandelt. Zur Entfernung der Proteine wurde Phenol in SSC zugesetzt, zentrifugiert (20000 x g, 20 Min., 0°C) und die wäßrige Phase gegen 0.2 SSC dialysiert.

CsCl-Dichtegradientenzentrifugation wurde wie beschrieben (siehe Seite 19) durchgeführt.

5. Chemikalien

NADH, FAD, FMN, Tri-isopropyl-naphthalinsulfonsäure-Na, Triton-X-100, DNase, RNase A und T_1 sowie die Chemikalien für die Elektrophorese wurden von der Firma Serva (Heidelberg) bezogen. Für die Gradientenzentrifugationen wurde RNase freie Saccharose von der Firma Schwarz-Mann Research Laboratories, New York, N. Y., verwendet. Alumina A-305, bacteriological grade, stammte von der Firma Alcoa (Pittsburgh), Na-sarcosinat von der Firma Schuchart (München), Bacto-Tryptone, Bacto-Antibiotic-Medium 3 und Agar von der Firma Difco (Detroit, Michigan), Rifampicin, 997 mcg/mg, von der Firma Grünenthal (Stolberg), Streptomycinsulfat von der Firma Bayer (Leverkusen). Alle übrigen Substanzen waren p.a.-Chemikalien der Firma Merck (Darmstadt).

III. Experimente und Ergebnisse

A. Ernährungsphysiologische Charakterisierung von POLYTOMA MIRUM

1. Versuche mit organischen N-Quellen

Voraussetzung für molekularbiologische sowie genetische Experimente ist die Kenntnis der Ernährungsphysiologie des Untersuchungsobjektes. Versuche in dieser Richtung sind an verschiedenen Stämmen der Gattung POLYTOMA gemacht worden (PRINGSHEIM 1937, LWOFF 1929, LWOFF und PROVASOLI 1935, LINKS et al. 1961). Dabei hat sich gezeigt, daß es von Art zu Art erhebliche Unterschiede in der Verwertung der einzelnen C- und N-Quellen gibt.

Ausgangspunkt für unsere Untersuchungen war das Vollmedium nach KOCH, das als organische N-Quelle Tryptone enthielt und ein gutes Gedeihen der Kultur auch ohne Hefe-Extrakt ermöglichte. Da Tryptone ein pankreatisch verdautes Casein darstellt und sich somit letztlich aus verschiedenen Aminosäuren aufbaut (FLASCHENTRÄGER 1951), sollten zunächst die einzelnen Aminosäuren auf ihre Verwertbarkeit als N-Quellen geprüft werden, um somit ein definiertes Medium zu erhalten.

Logarithmisch wachsende Zellen wurden mit Aqua dest. gewaschen und darin 12 - 15 Std. suspendiert. Während dieser Ausnahrungsperiode konnte noch Restteilung erfolgen, die sonst das Versuchsergebnis verfälschte.

Als Testmedium wurde das Vollmedium nach KOCH folgendermaßen abgeändert: Tryptone wurde durch die gleiche Menge der jeweiligen Aminosäure ersetzt, während Hefe-Extrakt völlig weggelassen wurde. 100 ml Lösung enthielten als Elektrolyte 0.02 % K_2HPO_4 , 0.01 % $MgSO_4 \times 7 H_2O$ und 0.1 ml Spurenelementlösung. Tryptone anstelle einer Aminosäure diente als Kontrolle.

Wie Abb. 4 zeigt, stellt Tryptone das beste Substrat dar. Die Verwertung der einzelnen Aminosäuren ist recht unterschiedlich und läßt sich in vier Gruppen einteilen. Stellvertretend für jede Gruppe wird eine Wachstumskurve wiedergegeben.

Arginin wird am besten verwertet, Glycin und Serin erlauben noch gutes Wachstum, während Asparaginsäure, Glutaminsäure, Alanin, Prolin, Leucin und Valin sich als weniger geeignet er-

weisen. Völlig unverwertbar sind Lysin, Phenylalanin, Threonin, Methionin, Cystein und Histidin.

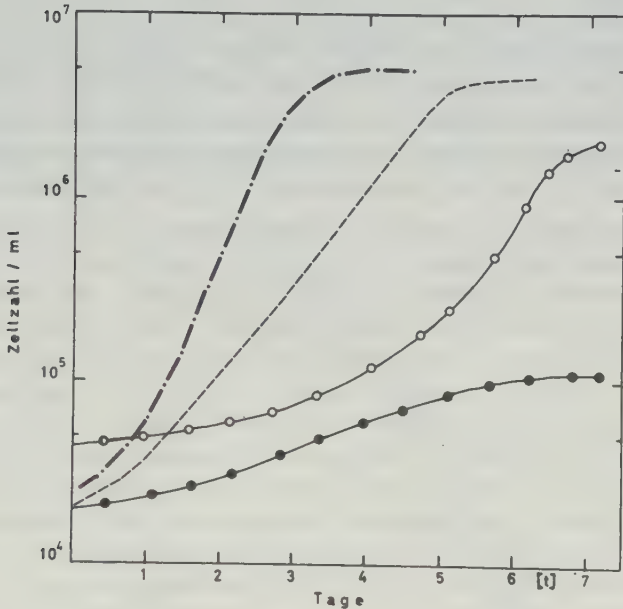


Abb. 4

Aminosäuren als N-Quellen

Arginin (---) wird am besten verwertet. Glycin und Serin erlauben noch gutes Wachstum (-o-). Asparaginsäure, Glutaminsäure, Alanin, Prolin, Leucin und Valin (-o-) sind als N-Substrate ungeeignet. Tryptone (-●-) läßt sich durch keine Aminosäure voll ersetzen.

Obwohl die Konzentration der angebotenen Aminosäuren 20 - 30 mal höher war als im Tryptone, konnte dennoch keine adäquate Zelldichte und Wachstumsdauer erreicht werden. Eine Erklärung für diese Erscheinung könnte die Tatsache sein, daß die Aminosäuren im Tryptone in phosphorylierter Form vorliegen und damit eine bessere Resorption gegeben sein könnte.

Optimales Gedeihen von POLYTOMA UVELLA gewährleistet ein

Substrat, das überhaupt kein Bestandteil des Tryptone ist, das Asparagin. LINKS und Mitarbeiter (1961) kommen darüber hinaus aufgrund ihrer Untersuchungen zu dem recht zweifelhaften Ergebnis, daß zur Verwertung dieses Nährstoffes keine Spurenelemente notwendig sind.

Die Überprüfung dieser Angaben sowie die Möglichkeit, eine bessere N-Quelle zu finden, war das Ziel der folgenden Versuche.

Als Testmedium diente - wie oben beschrieben - das modifizierte Vollmedium nach KOCH, das Asparagin als N-Quelle enthielt. Um den Einfluß der Spurenelemente auf das Wachstum der

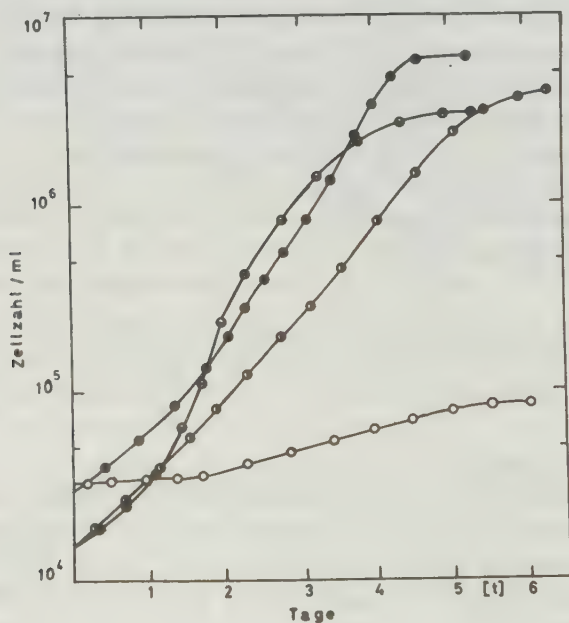


Abb. 5

Einfluß der Spurenelemente auf die Asparagin-Verwertung

Starke Reduzierung der Metallionenkonzentration durch EDTA-Zusatz (○-) führt zu signifikanter Wachstumshemmung, während die Metallionenkonzentration im Aqua dest. (○-) für eine gute Vermehrung ausreicht. Hohe Metallionenkonzentration (●-) hat in der log-Phase einen reprimierenden Effekt. Die besten Kulturbedingungen (●-) sind durch Spurenelementlösung nach HUTNER gegeben.

Kultur untersuchen zu können, wählten wir verschiedene Konzentrationen. Die Wachstumskurven in Abb. 5 zeigen deutlich die zu erwartende Abhängigkeit von dem Gehalt an Spurenelementen in der Nährlösung. Starke Reduktion der freien Metallionen durch Weglassen der Spurenelementlösung und Zusatz von EDTA (5 mg/100 ml), das im Aqua dest. vorhandene Metallionen durch Komplexbildung bindet, führt zu einer signifikanten Hemmung der Vermehrung. Verzichtet man auf den EDTA-Zusatz, so kommt es zu einer wesentlich verbesserten Verwertung von Asparagin. Die freie Metallionenkonzentration ist somit im Aqua dest. hinreichend groß.

Erhöht man die Konzentration noch weiter, indem man Spurenelementlösung ohne EDTA zusetzt, so kommt es zu einer Hemmung durch die Schwermetalle. Die Kurve verläuft während der log-Phase nicht ganz so steil wie bei dem Versuch mit Spurenelementlösung und gleichzeitigem EDTA-Zusatz. Die Zelldichte der stationären Phase ist im wesentlichen die gleiche, weil bis zu diesem Zeitpunkt durch den Verbrauch an Spurenelementen die freie Metallionenkonzentration so gering ist, daß der Hemmeffekt aufgehoben wird. Den günstigsten Verlauf zeigt die Wachstumskurve mit Spurenelementlösung und EDTA. Hier ist eine konstante Konzentration der Metallionen durch die Komplexbildung mit dem EDTA gewährleistet, so daß keine wachstumsbeeinflussenden Effekte auftreten. Die Zellen erreichen schnell die stationäre Phase mit maximaler Zelldichte.

Diese Ergebnisse sprechen eindeutig gegen die Befunde von LINKS und Mitarbeiter (1961); denn Spurenelemente sind zur Verwertung von Substraten immer notwendig. Darüber hinaus zeigt sich eine Korrelation zwischen Metallionenkonzentration und Wachstum der Kultur.

Mit Asparagin bzw. Arginin als N-Quelle einerseits und Glucose als C-Quelle andererseits war die Zusammensetzung eines definierten Vollmediums gegeben.

2. Versuche mit anorganischen N-Quellen

In den weiteren Untersuchungen ging es um die Frage, ob die Verwandtschaft der farblosen und grünen Formen allein auf morphologische Merkmale und Sexualitätsverhalten beschränkt ist, oder ob von seiten der Ernährungsphysiologie weitere Ge-

meinsamkeiten vorhanden sind. Solche Übereinstimmungen waren nur in der Verwertung von N-Quellen zu erwarten.

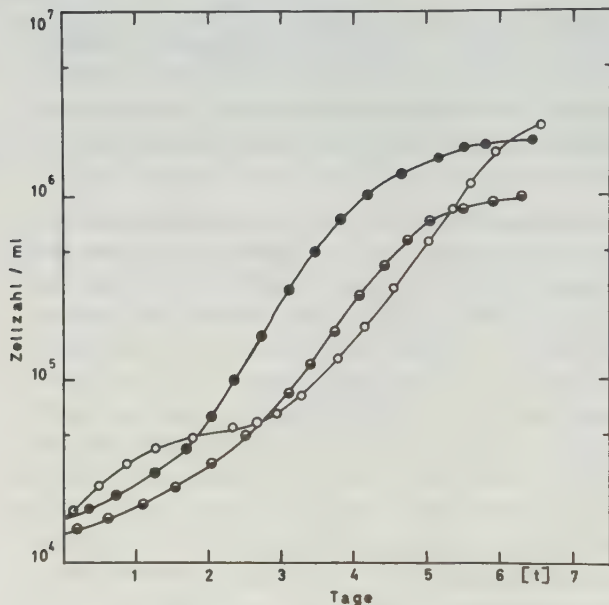


Abb. 6

Anorganische N-Quellen ohne Spurenelementzusatz

KNO₃ (●-●) wird am schlechtesten verwertet, während NH₄Cl (○-○) und NH₄NO₃ (●-●) besseres Wachstum erlauben.

Als anorganische N-Verbindungen wurden Ammoniumsalze und Nitrat geprüft. Das Nährmedium entspricht der oben beschriebenen modifizierten Form. Jedoch setzten wir nur 0.05 % anorganische N-Substrate zu, weil sich eine Erhöhung der Konzentration auf das Wachstum der Kultur als ineffektlos erwies. Die Wachstumskurven in Abb. 6 zeigen, daß die Entwicklung der Kultur mit Ammoniumsalzen bzw. mit Nitrat ohne Spurenelementzusatz wesentlich ungünstiger ist, als bei Asparagin als organische N-Quelle unter analogen Bedingungen. KNO₃ wird am schlechtesten

verwertet, während NH_4Cl und NH_4NO_3 besseres Wachstum erlauben; sie unterscheiden sich aber in der erreichbaren Zelldichte kaum. Somit führt ein Mehrangebot an Stickstoff im Falle des NH_4NO_3 zu keiner wesentlichen Verbesserung des Wachstums. Nitrat scheint unter diesen Bedingungen eine untergeordnete Rolle in der N-Verwertung zu spielen.

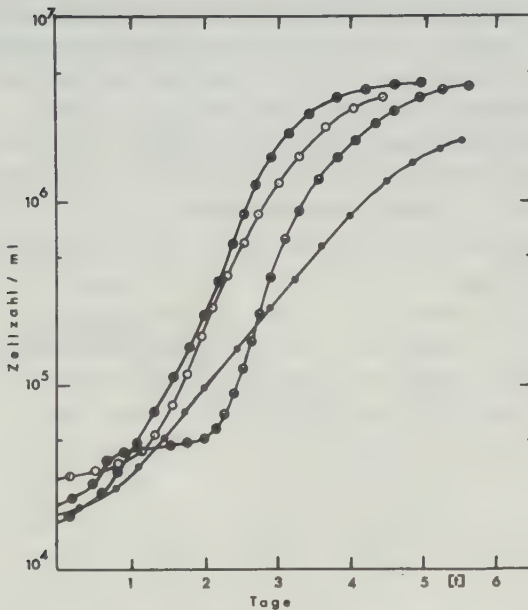


Abb. 7

Anorganische N-Quellen mit Spurenelementzusatz

Nitrat wird unter Spurenelementzusatz sehr gut verwertet. Die Wachstumskurve mit KNO_3 (—○—) zeigt die typische Plateauphase der Nitratinduktion. Eine Reduktion der Metallionenkonzentration durch die Spurenelementlösung nach HUTNER (—○—) führt im Vergleich zu der höheren Metallionenkonzentration durch die Spurenelementlösung ohne EDTA (—●—) zu keiner wesentlichen Änderung der NH_4NO_3 -Verwertung. NH_4Cl (—●—) stellt auch mit Spurenelementzusatz keine wesentlich bessere Kultivierungsmöglichkeit dar (vergleiche Abb. 6, Seite 28).

Erhöht man die Metallionenkonzentration durch Zusatz von Spurenelementlösung, so führt dies zu einer verbesserten Verwertung der N-Quellen (Abb. 7). Im KNO_3 -Medium hat die Kurve einen typischen Plateauverlauf, der die Zeitdauer der Induktion mit Bildung der Nitratreduktase darstellt. Erst mit der Anwesenheit dieses Enzyms ist eine Verwertung des Substrates (Nitrat) möglich. Die Fähigkeit der Nitratreduktion ist innerhalb der Gattung *POLYTOMA* nur noch bei der Art *OCELLATUM* gegeben (PRINGSHEIM 1963).

Eine derartige Latenzphase tritt bei NH_4Cl nicht auf, weil hier der Stickstoff bereits in der physiologischen Form angeboten wird. Aus dem gleichen Grund erklärt sich der Verlauf der NH_4NO_3 -Kurve. Weiterhin zeigt sich am Beispiel dieses Substrats, daß die freie Metallionenkonzentration durch Zusatz von Spurenelementlösung mit EDTA (nach HUTNER) oder ohne EDTA keine wesentliche Änderung des Kurvenverlaufs bewirkt.

Durch die Standardtests zum Nachweis der Nitratreduktase konnte gezeigt werden, daß das Enzym 24 - 48 Std. im nitrat-haltigen Medium gebildet wird. Im Vollmedium nach KOCH, das kein Nitrat enthält, ist auch keine Nitratreduktase nachweisbar. Als bester Elektronendonator erwies sich FMN (Flavinmononucleotid) mit einer Nitratmenge von 37 nM. NADH_2 (Nicotinamid-adenin-dinucleotid $\cdot \text{H}_2$) mit 11 nM Nitrit ist weniger geeignet.

Die Versuche zeigen deutlich, daß zwischen anorganischem Substrat und Spurenelementen für bestimmte Konzentrationsbereiche ein enger Zusammenhang besteht. Dies ist nicht verwunderlich, weil die Enzymsysteme zur Verwertung dieser N-Quellen Metalloproteine darstellen.

Überraschend waren diese Ergebnisse insofern, als sich die eingangs erwähnte Vermutung bestätigte: *POLYTOMA MIRUM* zeigt die Fähigkeit der Nitratverwertung. Dieses wichtige Kriterium unterstreicht die enge Verwandtschaft zu der Grünalge *CHLAMYDOMONAS* aus physiologischer Sicht. LWOFF (1951) bezeichnet diese Ernährungsweise als Mesotrophie, weil im Gegensatz zur Heterotrophie nur eine Nährstoffquelle (Glucose) in reduzierter Form angeboten wird.

3. Einfluß der anorganischen N-Quellen auf das pH der Nähr- lösung

Das Gedeihen einer Kultur ist nicht nur von der Wahl der Substrate und dem Zusatz von Spurenelementen abhängig, sondern auch von dem pH des Nährmediums. Die Entscheidung darüber wird bestimmt durch das pH am Fundort. *POLYTOMA MIRUM* (PRINGSHEIM 1954) kommt in Moortümpeln vor und bevorzugt deshalb ein schwach saures pH (7.0 - 5.0).

Diese Tatsache rechtfertigt eine gewisse Sonderstellung, da alle übrigen Vertreter der Gattung *POLYTOMA* im alkalischen Bereich wachsen.

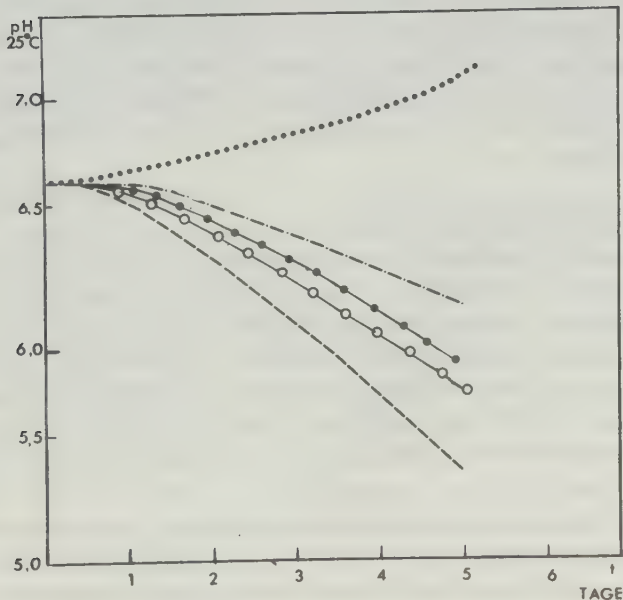


Abb. 8

Einfluß verschiedener Substrate auf das pH des Minimalmediums

Die Verwertung von NH_4Cl (---) führt zur stärksten pH-Änderung, während die Kultivierung mit NH_4NO_3 (○-○), Asparagin (●-●) und Tryptone (-.-) eine geringere Beeinflussung des pH zufolge hat. Bei der Anzucht mit KNO_3 (...) verschiebt sich das pH zum Neutralpunkt.

Die Abgabe sekundärer Stoffwechselprodukte sowie die Aufnahme von Substraten beeinflussen das pH. So führt in unserem Fall die Verwertung anorganischer N-Quellen zu deutlichen pH-Verschiebungen. Die Aufnahme von Ammonium hat eine Ansäuerung zur Folge, der Verbrauch von Nitrat eine Alkalisierung. Solche pH-Verschiebungen lassen sich durch Puffer in gewissen Grenzen kompensieren. Als Puffersystem dient $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{K}_2\text{HPO}_4$, m/15, pH 6.6. Damit ist die Zusammensetzung eines definierten Minimalmediums wie folgt gegeben: Glucose 0.2 %, NH_4NO_3 0.05 %, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0.01 %, Spurenelementlösung 0.1 ml, Phosphatpuffer 10 ml, H_2O ad 100 ml.

Abb. 8 zeigt den Einfluß der verschiedenen Substrate auf das pH des Minimalmediums. Stärkste pH-Änderung hat NH_4Cl zufolge, gefolgt von NH_4NO_3 , Asparagin und Tryptone. KNO_3 verschiebt das pH zum Neutralpunkt. Eine weitere Erhöhung der Molarität des Puffers zur Stabilisierung des pH ist nicht sinnvoll, weil die Ausschaltung der pH-Änderung während der Wachstumsphasen ein sehr schlechtes Gedeihen der Kultur mit sich bringt (PRINGSHEIM 1963).

4. Versuche zur Änderung der C-Quelle

Bei der Suche nach geeigneten chemischen Verbindungen als Substrate entdeckte PRINGSHEIM (1921) das Acetat. Beeindruckt von seinen Erfolgen bei der Gattung POLYTOMA führte er den Ausdruck Acetat-Flagellaten ein. Die Anwendung anderer Nährstoffe beschränkte sich auf die höheren Fettsäuren, die jedoch nicht von allen Stämmen verwertet werden konnten. Kohlehydrate und vor allem Glucose erwiesen sich als ungeeignet (PRINGSHEIM und MAINX 1926).

Erst mit CHLAMYDOMONAS PSEUDOCOCCUM (LUCKSCH 1933) und POLYTOMA MIRUM (PRINGSHEIM 1954) sind zwei Zuckerflagellaten gefunden worden, die unter der überwiegenden Anzahl von Acetat-Flagellaten eine Ausnahme bei den Volvocales darstellen.

Unsere Untersuchungen stellten eine Umkehrung der historischen Entwicklung dar und zielten darauf ab, Glucose durch andere C-Quellen zu ersetzen.

Als Substrate verwendeten wir Na-acetat, K-acetat und Asparagin. Diese Verbindungen wurden anstelle der Glucose dem

Minimalmedium in einer Konzentration von 0.2 % zugesetzt. Nach 21 Tagen wurde der Versuch abgebrochen, weil es bei keiner Versuchsserie zum Wachstum kam. Glucose ließ sich durch Acetat nicht ersetzen, d. h. POLYTOMA MIRUM ist ein reiner Zuckerflagellat.

Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Befunden von PRINGSHEIM (1954), der eine Vermehrung mit Acetat nachweisen konnte. Die ungenauen Angaben über die Zusammensetzung der Nährlösung lassen jedoch eine Diskussion nicht zu. Grundsätzlich wäre die Frage zu klären, wie PRINGSHEIM eine Acetat-Verwertung nachgewiesen hat.

Asparagin ist ebenfalls als C-Quelle nicht geeignet. Die alleinige Verwertung der Säureamidgruppe als N-Quelle könnte diese Tatsache erklären; denn das Reaktionsprodukt dieses Vorganges ist die Asparaginsäure, die ein sehr schlechtes Substrat ist (Abb. 4, Seite 25). Eine Desaminierung dieser Verbindung zu Oxalacetat ist aber die Voraussetzung für eine Verwendung als C-Quelle im Citronensäurezyklus.

5. Zusammenfassung

Asparagin und Arginin sind als organische N-Quellen sehr gut geeignet. Auch die Aminosäuren Glycin und Serin erlauben ein gutes Wachstum, während man mit Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin, Prolin und Valin nur geringe Zellzahlen erreicht. Unverwertbar sind Cystein, Histidin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin. Als anorganische N-Quellen können sowohl Ammoniumsalze als auch Nitrate verwendet werden. Spurenelementzusatz bewirkt eine deutliche Verbesserung der Verwertung. Glucose kann durch Acetat sowie Asparagin nicht ersetzt werden. Das Wachstum von POLYTOMA MIRUM im schwach sauren pH-Bereich, die Glucoseverwertung und die Fähigkeit der Nitratreduktion kennzeichnen die Sonderstellung in ihrer Gattung aus ernährungsphysiologischer Sicht. Die Nitratverwertung ist nur noch bei POLYTOMA OCELLATUM gegeben.

B. Ribosomenisolation bei CHLAMYDOMONAS REINHARDII, POLYTOMA MIRUM und ESCHERICHIA COLI

1. Entwicklung und Standardisierung der Methode

Voneinander abhängig entwickelte GALLING (1968) bei

CHLORELLA, HOOBER und BLOBEL (1969) bei CHLAMYDOMONAS Methoden zur Ribosomenisolation. Die beiden Verfahren unterscheiden sich in der Art des Zellaufschlusses und der Ribosomengewinnung.

Unsere Versuche mit diesen Methoden führten zur folgenden Beurteilung:

Der große Vorteil des Verfahrens nach GALLING liegt in der Isolierung der Ribosomen durch fraktionierende Zentrifugation. Dabei wird vom Homogenat zuerst die Grobpartikelfraktion P_{30} mit unzertrümmerten Zellen, Organellen und Stärke abgetrennt ($30000 \times g$, 30 Min., $0^{\circ}C$) und aus dem Überstand S_{30} die Ribosomen sedimentiert ($105000 \times g$, 2 Std., $0^{\circ}C$). Durch Zentrifugation bei $20000 \times g$, 20 Min., $0^{\circ}C$ wird die Ribosomensuspension von Verunreinigungen befreit. Der Überstand S_{20} enthält die gereinigten Ribosomen, die durch Messung bei 260 nm quantitativ erfaßt werden. Damit ist eine definierte Beladung des Saccharose-Gradienten mit der jeweils gewünschten Ribosomenmenge möglich. Die gute Reproduzierbarkeit der Ribosomentrennung ist das Ergebnis dieser Methode.

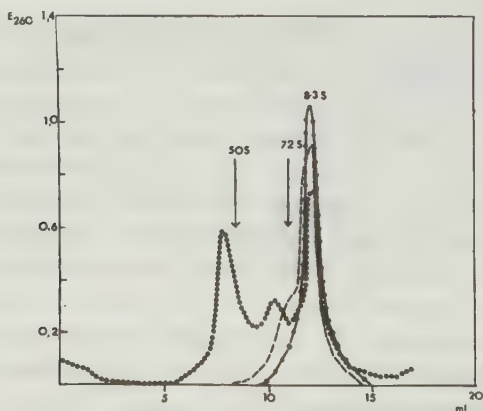


Abb. 9

Zellaufschluß mit der Bühler-Mühle bei CHLAMYDOMONAS REINHARDII

Das Auftreten ribosomaler Untereinheiten zeigt, daß die Aufschlußdauer von 3 Min. zu lang ist (●●●). Während bei einer Aufschlußzeit von 2 Min. (---) plastidäre 72 S-Ribosomen als Schulter nachweisbar sind, fehlt diese Ribosomenklasse bei der verkürzten Aufschlußdauer von 1 Min. (-●-).

Als entscheidender Nachteil ist der Zellaufschluß zu nennen. Die Zellen werden hierzu mit Glasperlen von 3 mm ϕ unter Zusatz von Isolationsmedium zu einer zähen Paste vermengt und in der Zelmühle (Firma Bühler, Tübingen) bei 4°C und entsprechender Zeitdauer aufgeschlossen. Abb. 9 zeigt das Ribosomenmuster von CHLAMYDOMONAS bei verschiedenen Aufschlußzeiten. Während für CHLORELLA 3 Min. das ideale Zeitmaß darstellten, sind bei CHLAMYDOMONAS nicht nur die Zellen aufgeschlossen, sondern die Ribosomen zum Teil in Untereinheiten zerlegt. Eine Reduzierung auf 2 Min. führt zu einer wesentlichen Verbesserung, wie das Auftreten der plastidären 72 S-Ribosomen zeigt. Jedoch deutet diese Schulter auf einen ungenügenden Aufschluß der Plastiden hin. Erwartungsgemäß findet man bei 1 Min. keine 72 S-Ribosomen mehr. Das Problem, die richtige Aufschlußzeit zu finden, wird dadurch erschwert, daß als weiterer Faktor die Konsistenz des Algen-Glasperlen-Isolationsmedium-Gemisches für den Aufschluß große Bedeutung besitzt. Bei konstanter Aufschlußzeit bewirkt eine zu dünne Suspension einen sehr schlechten Aufschluß, während eine zu dicke Konsistenz bereits die Zerstörung der Ribosomen zur Folge haben kann. Die Schwierigkeit, diese beiden Parameter günstig aufeinander abzustimmen, sowie die schlechte Reproduzierbarkeit ließen uns diese Aufschlußmethode als ungeeignet erscheinen.

Der Nachteil der Methode von GALLING ist zugleich der Vorteil der Methode von HOOBER und BLOBEL. Die Zellen werden hier im Isolationsmedium suspendiert und mit einer French-Pressure (American Instruments Co., Silver Springs) aufgeschlossen. Die Vorzüge dieses Verfahrens bestehen in der guten Reproduzierbarkeit, der großen Variationsbreite der Aufschlußquote und der leichten Aufarbeitung; denn das Homogenat kann sofort zentrifugiert werden, wodurch das aufwendige Abnutschen der Glasperlen entfällt. Abb. 10 zeigt die Ribosomenmuster von CHLAMYDOMONAS bei verschiedenen Drucken. Der Kurvenverlauf bei 20000 psi (= 1 lb/inch²) zeigt Ähnlichkeit mit dem Ergebnis der Bühler-Mühle bei 3 Min. Aufschlußdauer (Abb. 9, Seite 34). Auch hier sind die Ribosomen aufgrund des zu hohen Druckes bereits in Untereinheiten zerlegt. Bei 8000 psi treten die 72 S-Ribosomen als Schulter des 83 S-Gipfels auf, während die Isolation mit 4000 psi die beste Ausbeute an 72 S liefert.

Diese Versuche bestätigen Ergebnisse anderer Autoren (BOURQUE et al. 1971, SIERSMA und CHIANG 1971), wonach zum Aufschluß der CHLAMYDOMONAS-Zellen ein Druck von 4000 psi $\pm$ 500 psi am besten geeignet ist.

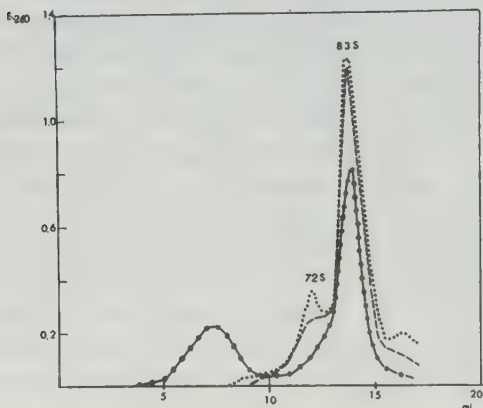


Abb. 10

Zellaufschluß mit der French-Pressure bei CHLAMYDOMONAS
REINHARDII

Der hohe Druck von 20000 psi (—●—) führt zum Auftreten ribosomaler Untereinheiten. Bei 8000 psi (---) treten die plastidären 72 S-Ribosomen als Schulter in Erscheinung. Die besten Aufschlußbedingungen sind bei 4000 psi (...) gegeben.

Die Anwendung von Triton-X-100 als Detergenz ist ein weiterer Vorzug dieser Methode. Vergleichende Versuche ergaben, daß eine Behandlung der Grobpartikelfraktion P_{30} mit 2.5 % Triton-X-100-Lösung die Ribosomenausbeute bis max. 70 % erhöht, während DOC-Na mit einer Zuwachsrate von max. 40 % sich als wenig geeignet erweist.

Der entscheidende Nachteil der Methode von HOOBER und BLOBEL liegt in der schlechten Reproduzierbarkeit der Ribosomentrennung. Das Homogenat wird nur bei 10000 x g geklärt und der Überstand S_{10} direkt auf den Saccharose-Gradienten geschichtet. Indem man auf die Isolierung der Ribosomen durch fraktionierende Zentrifugation verzichtet und zwangsläufig die aufzutra-

gende Ribosomenkonzentration nicht messen kann, ergeben sich die entsprechenden Nachteile. Neben der Reproduzierbarkeit ist auch die Aussagekraft der Ribosomenmuster keineswegs eindeutig; denn S_{10} enthält nicht nur Ribosomen, sondern auch andere UV-absorbierende Partikel. Nachgewiesen ist diese Erscheinung für die RuDPCase (EC 4.1.1.39), die im 20 S-Bereich eine Schulter der Ribosomenkurve verursacht (BOYNTON et al. 1972).

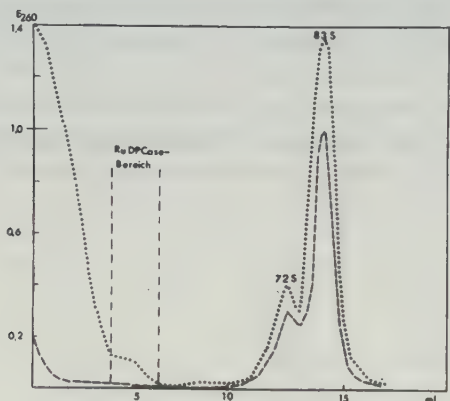


Abb. 11

Einfluß unterschiedlicher Isolierungsverfahren auf das Ribosomenmuster

Charakteristisch für die Methode von HOOBER und BLOBEL (...) ist das Auftreten hoher UV-Absorption in niedrigen S-Bereichen. Die Schulter bei 20 S ist auf das Enzym RuDPCase zurückzuführen. Der Kurvenverlauf der Präparation nach GALLING (---) beschränkt sich eindeutig auf die Verteilung der ribosomalen Partikel.

In Abb. 11 ist stellvertretend für jedes Isolationsschema der Kurvenverlauf dargestellt. Bei gleichem Ausgangspunkt - beide Proben wurden mit der French-Pressure bei 4000 psi aufgeschlossen - soll hier auf die Unterschiede der Ribosomenkurven hingewiesen werden. Die Methode nach GALLING liefert im wesentlichen UV-Absorption nur im 70 S - 80 S-Bereich sowie im geringen Maße durch flotierendes Triton-X-100 am Meniskus.

Für die Auftrennung der S_{10} -Fraktion ist das Auftreten weiterer UV-Absorption im 20 S-Bereich und in stärkerem Maße am Meniskus charakteristisch.

Die kritische Beurteilung dieser Versuche führte zur Entwicklung eines Verfahrens, das die beiden Methoden (GALLING 1968, HOOBER und BLOBEL 1969) kombiniert. Für den Zellaufschluß wählten wir die French-Pressure, die Ribosomenisolation durch Sedimentation nach GALLING wurde modifiziert, und zur Auftrennung der ribosomalen Präparationen mittels Saccharose-Gradientenzentrifugation führten wir den Ausschwingrotor SW 27.1 (Beckman Instruments, München) erstmals ein. Dieser Rotor ermöglicht im Gegensatz zum SW 27 (BOURQUE et al. 1971) das Arbeiten im analytischen Maßstab und hat den Vorteil gegenüber dem SW 65.1 (GALLING 1968) die längste Gradiententrennstrecke zu besitzen.

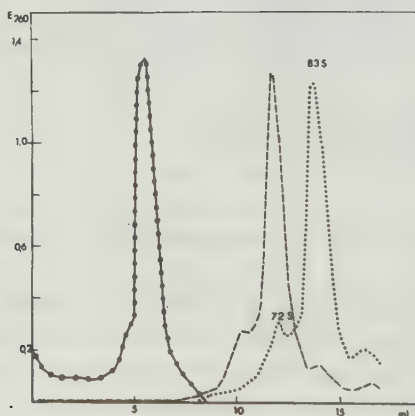


Abb. 12

Einfluß der Laufzeit und g-Zahl auf die Ribosomentrennung

Bei 95400 x g, 4 Std. (●●●) treten die 72 S-Ribosomen lediglich als Schulter des 83 S-Peaks auf, während nach 14 Std. bei 65800 x g (---) bereits eine bessere Auftrennung erfolgt. Die optimalen Bedingungen sind bei 75000 x g, 15 Std. (...) gegeben.

Die weiteren Experimente zielten darauf ab, optimale Beladung und Laufzeit der Gradienten mit diesem Rotor herauszufinden.

Abb. 12 zeigt den Einfluß der Laufzeit bzw. g-Zahlen auf die Trennung der Ribosomen. Bei 95400 x g, 4 Std., 2°C beginnt sich die 72 S-Position langsam abzuzeichnen. Eine Trennung von 72 S- und 83 S-Ribosomen zeigt sich bei 65800 x g, 14 Std., 2°C. Die besten Ergebnisse werden bei 75000 x g, 15 Std., 2°C erhalten. Als günstige Beladung erweist sich 3 - 6 OD₂₆₀ Ribosomen/Gradient.

Alle weiteren Versuche wurden nach diesem Schema, das unter dem Kapitel "Material und Methoden" genau beschrieben ist, durchgeführt. Abweichende Versuchsbedingungen sind jeweils angegeben.

2. Ergebnisse der Ribosomenisolation unbehandelter Zellen

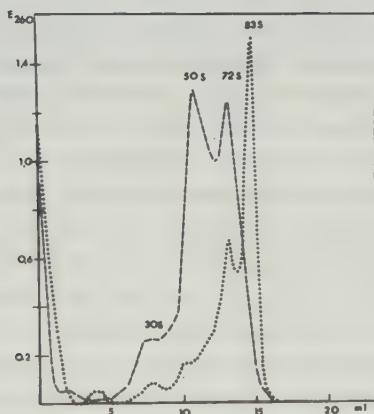


Abb. 13

Ribosomenmuster von CHLAMYDOMONAS REINHARDII und E. COLI

Die cytoplasmatischen 83 S-Ribosomen bilden das Hauptmaximum im Ribosomenmuster von CHLAMYDOMONAS (...), während der kleine Peak den plastidären 72 S-Ribosomen zugeordnet wird. E. COLI-Ribosomen (---) stimmen in den Sedimentationskonstanten mit den plastidären Partikeln überein und bestehen aus 30 S- und 50 S-Untereinheiten.

Die Auftrennung einer ribosomalen Präparation der phototroph kultivierten CHLAMYDOMONAS REINHARDII ist in Abb. 13 wieder-

gegeben. Typisch ist das Auftreten zweier unterschiedlich großer Peaks. Die schneller sedimentierende Fraktion befindet sich in Bodennähe des Gradienten und macht den Hauptanteil der Ribosomen aus. SAGER und HAMILTON (1967) zeigten, daß diese Komponente die cytoplasmatischen Ribosomen darstellt und die Sedimentationskonstante 83 S beträgt. Dieser Wert stimmt mit den Ergebnissen bei anderen Organismen (BOARDMAN et al. 1966, STUTZ und NOLL 1967) überein, so daß man die cytoplasmatischen Ribosomen allgemein als 80 S-Ribosomen bezeichnet.

Die Interpretation des kleineren Peaks war anfangs nicht eindeutig. Durch lineare Extrapolation läßt sich der S-Wert bestimmen und berechnet sich in unserem Beispiel auf 72 S. Ribosomen dieser S-Klasse erhält man in überwiegendem Maße durch Anreicherung der Chloroplastenfraktion. Darüber hinaus konnte OHAD et al. (1967) aufgrund elektronenmikroskopischer Aufnahmen zeigen, daß die Ribosomen in Plastiden kleiner sind als im Cytoplasma. Untersuchungen an der ac_{20} -Mutante von CHLAMYDOMONAS erbrachten weitere Beweise für den plastidären Ursprung der 72 S-Ribosomen (GOODENOUGH und LEVINE 1970). Da die S-Werte zwischen 68 und 72 S variieren können (BOURQUE et al. 1971), bezeichnet man die plastidären Ribosomen auch als 70 S-Ribosomen.

Die Mitochondrien besitzen ebenfalls 70 S-Ribosomen. Wie elektronenmikroskopische Betrachtungen zeigen, ist ihr Anteil relativ gering. Bei der Gradientenzentrifugation ribosomaler Präparationen bleiben die Mitochondrienribosomen aufgrund der kleinen Menge unberücksichtigt. Der 72 S-Peak bei CHLAMYDOMONAS REINHARDII ist letztlich nur auf plastidäre Ribosomen zurückzuführen. Diese Auffassung wird durch spätere Untersuchungen bestätigt.

Die physikalische Ähnlichkeit der plastidären Ribosomen mit den Bakterienribosomen (LOENING 1968) nutzen wir bei der Auswertung der Ribosomenkurven. Die Übereinstimmung in den S-Werten gibt uns die Möglichkeit, E. COLI-Ribosomen als Referenz für die 70 S-Position zu verwenden (Abb. 13, Seite 39). Dies erweist sich deshalb als notwendig, weil die Lage der Peaks in bestimmten Grenzen variieren kann und eine sichere Identifizierung nur durch Referenzribosomen möglich ist. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß E. COLI-Ribosomen und plastidäre Ri-

bosomen in dieselben Untereinheiten zerfallen, nämlich 50 S und 30 S. Somit kann man bei UV-Absorption in diesem Bereich sofort eine Aussage über S-Wert und Art der Partikel machen.

Die eindeutige, qualitative Interpretation der Ribosomenkurven war auf diese Weise gesichert. In weiteren Untersuchungen sollte die Möglichkeit geprüft werden, quantitative Aussagen über 72 S- bzw. 83 S-Ribosomen zu machen. BOURQUE und Mitarbeiter (1971) haben zur Lösung dieser Frage zwei unterschiedliche Methoden herangezogen. Zur direkten Berechnung der Ribosomenmengen nach Auftrennung durch den Saccharose-Gradienten extrapolierten sie die Peaks auf die Null-Linie und bestimmten durch Wägung der einzelnen, ausgeschnittenen Kurvenflächen die Ribosomenverteilung. Für den 72 S-Anteil errechneten sie so $36.5 \% \pm 1.6 \%$. Durch Auszählen der Ribosomen auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen und Extrapolation dieser Werte auf ein hypothetisches Zellvolumen erhielten sie 42 %. Bei kritischer Beurteilung dieser Methoden kann man gegen das erste Verfahren keine grundsätzlichen Bedenken anführen, während bei der Berechnung über das hypothetische Zellvolumen die Morphologie zwangsläufig schematisiert wird, und diese Ergebnisse den biologischen Gegebenheiten nur annäherungsweise gerecht werden können. Wir haben uns deshalb entschlossen, das erste Verfahren in modifizierter Form als quantitative Auswertungsmethode zu benutzen.

Ausgehend von den Ribosomenkurven nach Auftrennung durch den Saccharose-Gradienten werden die Kurvenäste der einzelnen Peaks auf die Null-Linie extrapoliert (Abb. 14, Seite 42). Jeder einzelne Kurvenast stellt damit eine Parabel dar, deren Scheitel auf der Null-Linie liegt. Die Fläche einer solchen Parabel läßt sich allgemein nach der Formel $F = \frac{y \cdot (x-x_0)^2}{3}$ berechnen. Da jeder Peak aus zwei Kurvenästen besteht, errechnet sich die Gesamtfläche aus der Summe der beiden Einzelflächen. Auf diese Weise kann man den prozentualen Anteil der verschiedenen Ribosomenklassen bestimmen. Einschränkend muß gesagt werden, daß unser Verfahren ebenfalls nur Nährungswerte liefert. Jedoch erscheint uns die mathematische Berechnung genauer als die reine graphische Auswertung von BOURQUE, weil wir mit unserer Methode auch sich überschneidende Kurvenflächen bei der

Auswertung berücksichtigen können (Abb. 14).

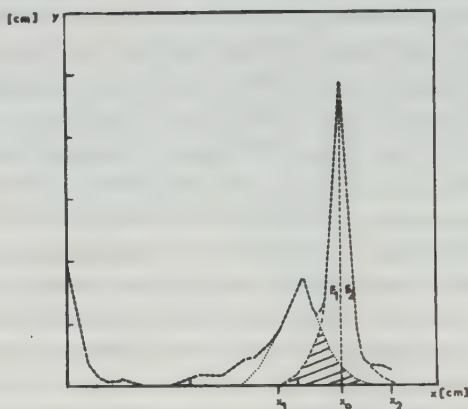


Abb. 14

Quantitative Auswertung der Ribosomenkurven

Die Extrapolation der beiden Kurvenäste des 83 S-Peaks auf die Null-Linie (x-Achse) ergibt zwei Parabeln mit den Scheitelpunkten x_1 und x_2 . Die Fläche einer Parabel errechnet sich allgemein nach der Formel $F = \frac{y}{3} (x - x_0)$. Da x_0 als Koordinatenursprung gewählt wird, hat es den Wert Null. Die Formel zur Berechnung der Gesamtfläche der 83 S-Kurve vereinfacht sich zu dem Ausdruck $F_{83\ S} = F_1 + F_2 = \frac{y}{3} (x_1 + x_2)$.

Unsere Untersuchungen mit phototroph kultivierten *CHLAMYDOMONAS REINHARDII* Zellen ergaben, daß zwischen Zelldichte und Prozentanteil von 72 S-Ribosomen ein Zusammenhang besteht (Tab. 1). Bei einer Zellzahl von $1.3 - 2.6 \times 10^6$ Zellen/ml erhält man eine mittlere Ausbeute von 34.1 % plastidären Ribosomen. Die höchsten Werte liegen bei einer Zelldichte von $1.8 - 2.3 \times 10^6$ Zellen/ml. Eine weitere Zunahme der Zellzahl führt zu einer starken Reduzierung der 72 S-Ribosomen und einer relativen Zunahme der cytoplasmatischen Ribosomen. Im Bereich von $2.9 - 6.0 \times 10^6$ Zellen/ml ergibt sich als Mittelwert 23.2 %. Der Anteil an 72 S-Ribosomen ist von der Wachstumsphase der Kultur abhängig. Hohe Werte liefern Präparationen von logarithmisch wachsenden Kulturen, während die stationäre Phase durch die signifikante Reduzierung plastidärer Ribosomen charakterisiert ist.

Zellzahl [Zellen/ml $\times 10^6$]	% Anteil an 70 S-Ribosomen	Gesamtausbeute an Ribosomen bezogen auf 100 ml Kultur und 10^6 Zellen [OD ₂₆₀]
1,32	33,7	7
1,84	35,2	10
2,32	37,3	15
2,62	30,1	16
2,91	27,8	18
3,42	23,4	17
4,33	27,7	8
6,04	19,1	6

Tab. 1

Abhängigkeit der Ribosomenausbeute von der Zellzahl

Der Prozentanteil an 72 S-Ribosomen liegt bei einer Zelldichte von $1.8 - 2.3 \times 10^6$ Zellen/ml am höchsten. Maximale Gesamtausbeute an Ribosomen erhält man bei 2.9×10^6 Zellen/ml.

Diese Ergebnisse sind vor allem bei Versuchen mit Antibiotika von großer Bedeutung; denn quantitative Aussagen über Beeinflussung der Ribosomensynthese durch Hemmstoffe können nur dann exakt gemacht werden, wenn man die Zellzahl in die Betrachtung einbezieht.

Die Reproduzierbarkeit des Verhältnisses 72 S / 83 S bei gleichen Präparationen liegt zwischen 1.0 - 1.5 %. Größere Abweichungen zeigen die Gesamtflächen der 72 S- und 83 S-Peaks bei gleichen Versuchen. In Abb. 15 sind zwei Auftrennungen ribosomaler Präparationen dargestellt. Während sich für die 72 S-Flächen Werte von 35.2 % bzw. 35.8 % ergeben, beträgt die Gesamtfläche der 4.2 OD₂₆₀-Kurve 54.8 cm² bzw. für die 5.0 OD₂₆₀-

Kurve 27.2 cm². Bei nahezu gleicher Beladung der Gradienten unterscheiden sich hier die Gesamtflächen um das Doppelte.

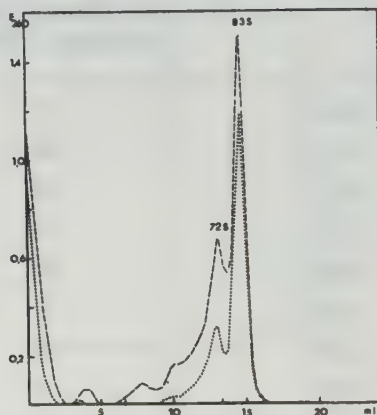


Abb. 15

Unterschiedliche Gesamtflächen bei gleichen Präparationen

Die Beladung eines Gradienten mit 5.0 OD₂₆₀ (...) ergibt eine Gesamtfläche für das Ribosomenmuster von 27.2 cm². Bei der Auftrennung von 4.2 OD₂₆₀ (---) derselben Ribosomenpräparation errechnet sich eine Gesamtfläche von 54.8 cm². Die prozentuale Verteilung 83 S / 72 S bleibt unverändert.

Eine Erklärung für dieses Phänomen konnten wir nicht finden. Diese Experimente sind aber andererseits eine Bestätigung der Angaben von BOURQUE et al. (1971), die solche Ergebnisse auch beschreiben. Für die weiteren Untersuchungen ist diese Diskrepanz bedeutungslos, weil die Prozentangaben stets Relativwerte sind.

Die Art der Kultivierung hat auf die Menge an 72 S-Ribosomen keinen signifikanten Einfluß. Bei phototropher, mixotropher oder heterotropher Anzucht zeigen sich bei vergleichbaren Zelldichten keine Unterschiede in dem Anteil plastidärer Ribosomen. Das Auftreten verschiedener Ribosomenklassen ist auf die 83 S- (= cytoplasmatischen) Ribosomen und 72 S- (= plastidären) Ribosomen im wesentlichen beschränkt. Gelegentlich treten in unbedeutendem Maße (≤ 5 %) im 66 S- und 41 S-Bereich ribosomale Untereinheiten auf.

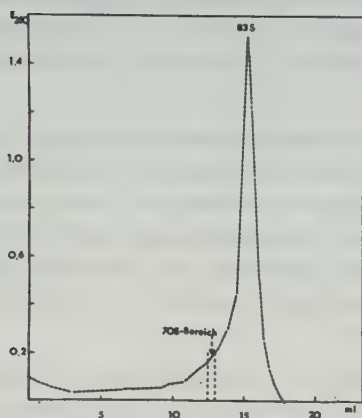


Abb. 16

Ribosomenmuster von POLYTOMA MIRUM

Neben den cytoplasmatischen Ribosomen ist kein weiterer Peak nachzuweisen. Auffällig ist die vorhandene UV-Absorption im 70 S-Bereich, die eine mögliche Existenz plastidärer Ribosomen nicht ausschließt.

Während das Vorhandensein von Ribosomen in Chloroplasten mehrfach und mit unterschiedlichen Methoden nachgewiesen wurde, sind solche Untersuchungen über die genetische Funktion an farblosen Plastiden bisher kaum gemacht worden. Zur Untersuchung dieser Frage isolierten wir Ribosomen aus der farblosen Alge POLYTOMA MIRUM. Der Kurvenverlauf dieser Ribosomenpräparation ist in Abb. 16 nach Auftrennung durch den Saccharose-Gradienten wiedergegeben. Die Sedimentationskonstante der cytoplasmatischen Ribosomen beträgt 83 S und stimmt mit dem bei CHLAMYDOMONAS REINHARDII gefundenen Wert überein. Auffällig ist am Ribosomenmuster von POLYTOMA MIRUM das Fehlen eines 72 S-Peaks.

Deshalb isolierten wir zunächst Ribosomen aus unterschiedlich alten Kulturen, da sich bei CHLAMYDOMONAS REINHARDII eine Abhängigkeit zwischen Zellzahl und Prozentgehalt an 72 S-Ribosomen herausgestellt hatte. Bei keinem dieser Versuche konnte ein 72 S-Peak in den Ribosomenkurven nachgewiesen werden. Eine signifikante Änderung der UV-Absorption in diesem Bereich des Gradienten ließ sich ebenfalls nicht feststellen.

Obwohl diese Ergebnisse das Fehlen eines 72 S-Peaks bestätigen, kann dies jedoch nicht als Beweis für die Abwesenheit plastidärer Ribosomen gewertet werden. Die vorhandene UV-Absorption in diesem Bereich fordert grundsätzlich die Existenz von Ribosomen.

Zur Klärung dieser Frage muß man folgende Hypothese diskutieren: Zunächst könnte man sich vorstellen, daß ein kleiner 72 S-Peak vorhanden ist, der aber von der auslaufenden 83 S-Kurve überdeckt wird. Das Ribosomenmuster würde damit ein Fehlen von 72 S-Ribosomen vortäuschen, die aufgrund der geringen Menge plastidären und eventuell auch mitochondrialen Ursprungs sein könnten.

Als Alternative muß man die Möglichkeit in Betracht ziehen, daß der 72 S-Bereich nur von den cytoplasmatischen Ribosomen der auslaufenden 83 S-Kurve gebildet wird. Das Ribosomenmuster würde damit die Anwesenheit von 72 S-Ribosomen vortäuschen. Diese Vorstellung ist aber aufgrund der relativ hohen UV-Absorption unwahrscheinlich und kann in späteren Experimenten widerlegt werden.

Die Frage nach den plastidären Ribosomen bei POLYTOMA MIRUM mußte durch die Routinemethode der Ribosomenisolation solange unbeantwortet bleiben, als die Interpretation des Kurvenverlaufs im 70 S-Bereich nicht geklärt war.

Eine klare und eindeutige Lösung dieses Problems wäre durch die Plastidenisolation gegeben gewesen, die aber aufgrund der zerklüfteten Gestalt der Organelle und des Fehlens von intraplastidären Strukturen nicht möglich war (Abb. 1, Seite 5).

Wir versuchten deshalb, den 70 S-Bereich durch fraktioniertes Ernten der Gradienten zu sammeln und so eine Anreicherung dieser Ribosomen zu erhalten. Um die notwendige Ribosomenmenge auf diese Weise zu bekommen, war die Aufarbeitung von Massenkulturen erforderlich, die ihrerseits eine Abänderung der Isolationsmethode zur Folge hatte.

Ausgehend von 5 Liter Kultur werden die Ribosomen - wie bei Material und Methoden beschrieben - bei 105000xg sedimentiert. Die Messung der resuspendierten Ribosomen bei 260 nm ohne Verstärkung ergibt eine Ausbeute von 1350 OD. Die Auftrennung dieser Mengen ist mit dem SW 271 nicht mehr möglich, so daß wir auf den SW 27 ausweichen mußten, der eine größere

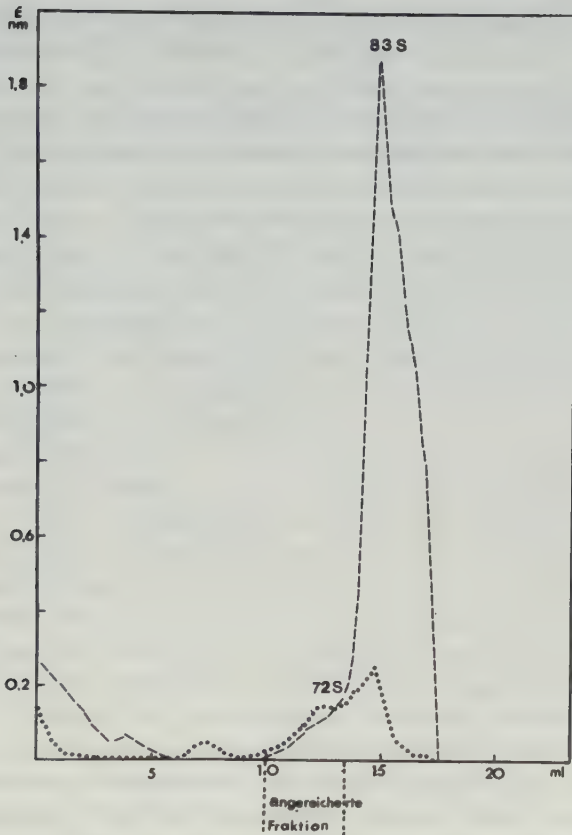


Abb. 17

Anreicherung der 70 S-Fraktion und erneute Auftrennung dieser Ribosomenpräparation

Die Ribosomen von POLYTOMA MIRUM werden zunächst mit dem SW 27 aufgetrennt (---). Durch fraktioniertes Ernten der Gradienten bei 293 nm wird der 70 S-Bereich gesammelt. Diese angereicherte Präparation wird erneut mit dem SW 27.1 zentrifugiert und bei 260 nm geerntet. 72 S-Ribosomen sind nun nachweisbar (...).

Kapazität besitzt. Da bei normaler Beladung der Gradienten (= 100 OD₂₆₀/Röhrchen) dieser 6-Positionen Rotor nicht ausreichen würde, und die Aufarbeitung des gesamten Materials bei einmaliger Zentrifugation erforderlich ist, bleibt die Überladung

der Gradienten (= 200 - 300 OD₂₆₀/Röhrchen) die einzige Möglichkeit. Nach der Zentrifugation mit dem SW 27 bei 22500 UPM, 14 Std., 2°C werden die Gradienten geerntet. Die Aufzeichnung solcher Gradienten kann nicht bei 260 nm erfolgen, und wir benutzen deshalb die Wellenlänge im Bereich von 290 nm, weil man hier außerhalb des Absorptionsmaximums liegt. In Abb. 17 ist die Ribosomenkurve wiedergegeben, die nach dieser modifizierten Methode mit dem SW 27 erhalten wird.

Die Fraktionen im 70 S-Bereich werden von allen Gradienten gesammelt und mit gleichem Volumen Isolationsmedium auf 10 % Saccharose verdünnt. Durch Zentrifugieren bei 105000 x g, 2°C, 4 Std. werden die Ribosomen erneut sedimentiert. Der Überstand zeigt keine UV-Absorption mehr. Die Ausbeute an Ribosomen beträgt nur 10 OD₂₆₀, d. h. die UV-Absorption in diesem S-Bereich beläuft sich auf weniger als 1/100 der gesamten Ribosomenmenge. Eine Auftrennung dieser Präparation ist ebenfalls in Abb. 17 dargestellt. Auffallend an diesem Kurvenverlauf ist die Tatsache, daß trotz der starken Anreicherung ein ausgesprochen kleiner Peak in der 72 S-Position auftritt. Dieses Ergebnis deutet auf die grundsätzliche Möglichkeit des Vorhandenseins plastidärer Ribosomen hin. Beweisend kann diese Aussage aber deshalb wiederum nicht sein, weil als wichtiges Gegenargument die Mitochondrien angeführt werden müssen, die ebenfalls 72 S-Ribosomen besitzen. Dies ist insofern berechtigt, wenn man die außergewöhnlich geringen Mengen der gefundenen 72 S-Ribosomen im Verhältnis zu der Gesamtmenge betrachtet. Zum anderen ist dieser Einwand nicht direkt widerlegbar, weil die Synthese mitochondrialer Ribosomen ohne Abtöten der Zellen nicht blockiert werden kann, und die Mitochondrien intakt und quantitativ aus dem Zellhomogenat nicht isoliert werden können.

Die Frage nach dem Ursprung dieser 72 S-Ribosomen war auf direktem Wege nicht zu beantworten. Wir versuchten deshalb durch indirekte Beweisführung zu bestätigen, daß ein eventuelles Vorhandensein plastidärer Ribosomen in POLYTOMA MIRUM nur auf den 72 S-Typ beschränkt ist. Die Möglichkeit der Existenz plastidärer Ribosomen mit S-Werten zwischen 72 S und 83 S mußte deshalb ausgeschlossen werden. Solche plastidären Partikel treten aber aufgrund der Gauß'schen Verteilung der cytoplasmatischen Ribosomen bei der normalen Isolationsmethode nicht in Erscheinung.

Ziel der weiteren Untersuchungen war es deshalb, die Existenz solcher Ribosomenklassen im Plastiden von *POLYTOMA MIRUM* durch geeignete Methoden auszuschließen.

3. Einfluß von Rifampicin auf Wachstum und Ribosomensynthese

Das Antibiotikum Rifampicin wirkt bei *CHLAMYDOMONAS REINHARDII* als spezifischer Inhibitor der Transcription an der Chloroplasten-DNA (SURZYCKI 1969). Diese Verbindung bildet mit der ungebundenen, freien RNA-Polymerase des Chloroplasten einen stabilen Komplex und hemmt so die Synthese der gesamten RNA-Arten. Bei entsprechender Einwirkungsdauer führt dies zur Verminderung der Ribosomen, m-RNA und t-RNA sowie zur starken Reduzierung bestimmter Enzymaktivitäten und Störungen in der Feinstruktur des Plastiden (LEVINE et al. 1970, GOODENOUGH et al. 1971, LEVINE et al. 1971). Auf die RNA-Synthese der Mitochondrien hat Rifampicin in vivo sowohl bei *CHLAMYDOMONAS* (SURZYCKI 1969) als auch bei anderen Eukaryoten (WINTERSBERGER und WINTERSBERGER 1970, HERZFELD 1970) keinen Einfluß. In vitro dagegen konnten KÜNTZEL und SCHÄFER (1971) eine Bindung zwischen der gereinigten, mitochondrialen RNA-Polymerase und Rifampicin nachweisen. Die RNA-Synthese des Kerns wird allgemein durch das Antibiotikum nicht beeinflusst (HARTMANN et al. 1967, FIUME und WIELAND 1970).

Ziel unserer Untersuchungen war die Charakterisierung der plastidären Ribosomen unter Einwirkung von Rifampicin. Dabei sollte auch die Frage geklärt werden, inwieweit eine Beziehung zwischen Dosis des Antibiotikum und Ribosomenzahl quantitativ erfaßbar ist.

Zunächst werden Wachstumskurven bei verschiedenen Rifampicin-Konzentrationen und Inkubationszeiten bestimmt. Das Antibiotikum wird bei 4°C in einem Gemisch aus 9 ml Phosphatpuffer pH 6.8 und 1 ml Salzsäure 1 n gelöst und in einer Dosierung von 250 µg, 200 µg und 100 µg/ml phototroph kultivierten *CHLAMYDOMONAS*-Zellen zugesetzt. Die Inkubation mit der Droge wird frühestens 48 Stunden nach Beimpfen der AnzuchtKolben durchgeführt. Unter diesen Bedingungen wirkt die höchste Dosierung letal. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Angaben von GOODENOUGH (1971) und LEVINE (1971), die bei 250 µg/ml Rifampicin keinen wachstumshemmenden Effekt finden. Als Erklärung ist

die unterschiedliche Wahl der Einwirkungsdauer oder des Inkubationszeitpunktes denkbar. Andererseits könnte man eine größere spezifische Aktivität unseres Rifampicin annehmen, da dieses Antibiotikum je nach Herstellerfirma verschiedene Wirkungsintensität besitzt (persönl. Mitteilung von GILLHAM).

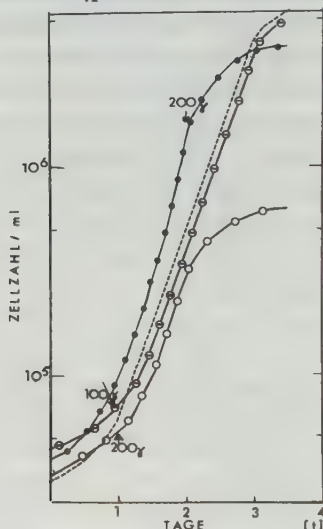


Abb. 18

Wachstum von CHLAMYDOMONAS REINHARDII unter Rifampicin-Einfluß

Bei 100 µg/ml Rifampicin, 48 Std. (○) unterscheidet sich die Wachstumskurve gegenüber der Kontrolle (---) nicht. Ein wachstumshemmender Effekt tritt bei 200 µg/ml Rifampicin, 24 Std. (-●-●-) bzw. 48 Std. (-○-○-) auf.

Bei 100 µg/ml Rifampicin und 48 Std. Einwirkungsdauer finden wir keine Beeinflussung des Wachstums (Abb. 18). Diese Dosierung hemmt bei isolierten Chloroplasten bereits den Einbau von ¹⁴C-Adenin (SURZYCKI 1969).

Verdoppelung der Giftkonzentration bei halber Inkubationsdauer zeigt einen inhibierenden Effekt auf das Wachstum. Bei 200 µg/ml Rifampicin kommt es nach 24 Std. Einwirkungsdauer zu einem Abknicken des Kurvenverlaufs. Noch deutlicher ist die Wachstumshemmung bei gleicher Dosis und verdoppelter Inkubationsdauer. 200 µg/ml Rifampicin reduzieren nach 48-stündiger Einwirkung die Zellzahl auf die Hälfte des Wertes gegenüber der Kontrolle.

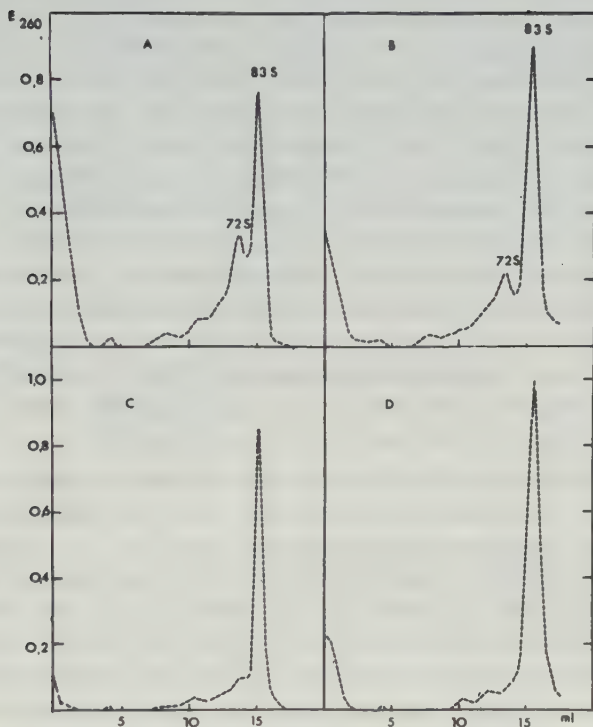


Abb. 19

Einfluß von Rifampicin auf die Ribosomensynthese bei *CHLAMYDOMONAS REINHARDII*

100 µg/ml Rifampicin, 48 Std. reduzieren die Zahl der 72 S-Ribosomen um 10 % (B) gegenüber der Kontrolle (A). Bei 200 µg/ml Antibiotikum, 24 Std. beträgt die Verminderung 50 % (C). Keine plastidären Ribosomen sind bei 200 µg/ml Rifampicin, 48 Std. nachzuweisen (D).

Vergleicht man die Werte der Wachstumsmessungen mit den entsprechenden Ribosomenkurven, so zeigt sich eine deutliche Übereinstimmung in der Abhängigkeit zwischen Dosis bzw. Inkubationsdauer des Antibiotikum und Wirkung auf Wachstum sowie Ribosomensynthese (Abb. 19). Während bei 100 µg/ml Rifampicin

und 48 Std. Einwirkungsdauer die Zahl der 72 S-Ribosomen nur um 10 % gegenüber der Kontrolle reduziert ist, führt die verkürzte Inkubationszeit von 24 Std. bei 200 µg/ml Rifampicin zu einer Verminderung der plastidären Ribosomen um fast 50 %. Eine Erhöhung der Konzentration verstärkt den Wirkungseffekt der Droge signifikanter als eine Verlängerung der Inkubationszeit. Dies mag zum Teil in der Lichtempfindlichkeit von Rifampicin begründet sein (BUCK 1971). Keine plastidären Ribosomen sind bei 200 µg/ml Rifampicin und 48 Std. Inkubationsdauer nachzuweisen. Die Ribosomenkurve von *CHLAMYDOMONAS REINHARDII* verläuft unter diesen Bedingungen genauso wie die Kurve von *POLYTOMA MIRUM* ohne Antibiotikum. Einschränkend muß gesagt werden, daß eine Anreicherung des 70 S-Bereiches und nochmalige Zentrifugation - wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben - aufgrund des zu geringen Kulturmateri als nicht durchgeführt werden konnte, und eine quantitative Aussage über eventuell noch vorhandene 72 S-Ribosomen nicht möglich ist.

Die Anwendung von Rifampicin bei *POLYTOMA MIRUM* sollte in erster Linie die grundsätzliche Frage nach dem Vorhandensein plastidärer Ribosomen klären. Ausgehend von der Überlegung, daß in diesem Organismus plastidäre Ribosomen vorkommen könnten, die sich entweder im S-Wert von den cytoplasmatischen Ribosomen nur geringfügig unterscheiden oder sogar die gleiche Sedimentationskonstante besitzen (MORIMOTO und HALVORSON 1971), ist der experimentelle Beweis für die eine oder andere diskutierte Möglichkeit mit der Gradientenzentrifugation allein nicht möglich. Wie die Versuche mit *CHLAMYDOMONAS REINHARDII* zeigen, hemmt Rifampicin spezifisch die Synthese plastidärer Ribosomen. Die Verwendung dieses Antibiotikum ermöglicht so die experimentelle Überprüfung der geäußerten Vermutungen, indem wir das Ribosomenmuster Rifampicin-behandelter Zellen mit der Kontrolle vergleichen können.

Da hinsichtlich der Verträglichkeit des Antibiotikum bei *POLYTOMA MIRUM* nichts bekannt war, bestimmten wir zunächst die Wachstumskurven bei unterschiedlichen Rifampicin-Konzentrationen (Abb. 20). Die Inkubationszeit des Antibiotikum erstreckte sich auf die gesamte Wachstumsphase. Bei Dosierung zwischen 50 - 100 µg/ml Rifampicin zeigt sich eine deutliche Wachstumshemmung gegenüber der Kontrolle. Die Toleranzgrenze, bei der das

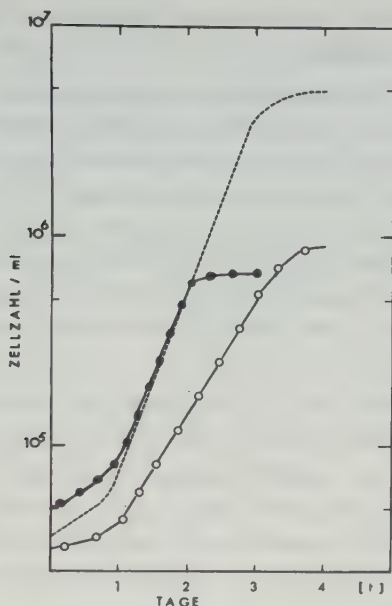


Abb. 20

Einfluß von Rifampicin auf das Wachstum von POLYTOMA MIRUM

Im Bereich von 50 - 100 µg/ml Rifampicin tritt eine Wachstums-
hemmung (-o-o-) gegenüber der Kontrolle (---) auf. Bei 150 µg/
ml verstärkt sich dieser Effekt (-●-●-).

Wachstum der Zellen durch das Antibiotikum unbeeinflusst bleibt,
liegt bei POLYTOMA MIRUM bedeutend niedriger als bei CHLAMYDO-
MONAS REINHARDII. Während die Grünalge bei 100 µg/ml Rifampicin
gut gedeiht, tritt bei dem Flagellaten in diesem Dosierungsbe-
reich eine signifikante Wachstumshemmung auf.

Diese inhibierende Wirkung wird bei Konzentrationen von
150 µg/ml noch deutlicher. Die stationäre Phase ist bereits
nach 48 Std. erreicht. Die Zellzahl ist gegenüber der Kontrolle
um mehr als die Hälfte reduziert. Dosierungen von über 150 µg/ml
Rifampicin wirken bei POLYTOMA MIRUM letal.

Diese erhöhte Empfindlichkeit gegenüber dem Antibiotikum
ist insofern überraschend, als bei einer eventuellen Abwesen-
heit plastidärer Ribosomen eine höhere Verträglichkeit zu er-
warten ist. Dieses differierende Verhalten von CHLAMYDOMONAS

und POLYTOMA gegenüber dem Antibiotikum spricht für eine unterschiedliche Membranpermeabilität.

Zur Gewinnung der Ribosomen werden die Zellen entweder mit 100 µg/ml Antibiotikum während der gesamten Wachstumsphase inkubiert oder mit 120 - 140 µg/ml nur 48 Std. lang behandelt. Ein Vergleich dieser Ribosomenkurven mit der Kontrolle zeigt keinerlei Unterschiede. Damit ist nachgewiesen, daß POLYTOMA MIRUM keine plastidären Ribosomen besitzt, die von dem normalen 72 S-Typ abweichen. Dieser Befund unterstützt das Ergebnis des Anreicherungsversuches, bei dem 72 S-Ribosomen nachgewiesen werden konnten (Abb. 17, Seite 47).

Das Vorhandensein von 72 S-Ribosomen im Plastiden von POLYTOMA MIRUM erscheint deshalb weiterhin diskutierbar.

Einschränkend muß darauf hingewiesen werden, daß bei dem Antibiotikum-Versuch eine Wirksamkeit des Rifampicin bei POLYTOMA MIRUM nicht durch biochemische Daten abgesichert ist. Die Beeinflussung des Wachstums durch das Antibiotikum spricht jedoch für einen Effekt.

Um die Aussagekraft der Rifampicin-Versuche zu bestätigen, charakterisierten wir die Ribosomen von CHLAMYDOMONAS und POLYTOMA bei verschiedenen Mg^{2+} -Konzentrationen.

4. Einfluß der Mg^{2+} -Konzentration auf das Sedimentationsverhalten der Ribosomen

Die cytoplasmatischen Ribosomen unterscheiden sich von den 72 S-Ribosomen nicht nur durch die höhere Sedimentationskonstante, sondern auch in dem Verhalten gegenüber niedrigen Mg^{2+} -Konzentrationen (TASHIRO und SIEKEVITZ 1965). Ribosomen des Prokaryoten-Typs zerfallen bei Verringerung der Mg^{2+} -Konzentration leichter in die Untereinheiten als die cytoplasmatischen Partikel. Dabei kann während der sukzessiven Reduzierung der der Mg^{2+} -Ionen zunächst nur eine Abnahme des S-Wertes der plastidären Ribosomen auftreten und im weiteren Verlauf erst der Zerfall in die Untereinheiten.

Dieses unterschiedliche Stabilitätsverhalten der beiden Ribosomentypen in Abhängigkeit von der Mg^{2+} -Konzentration stellt eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung plastidärer Ribosomen bei POLYTOMA MIRUM dar. Zum Vergleich untersuch-

ten wir den Einfluß der Mg^{2+} -Konzentration auf das Sedimentationsverhalten der Ribosomen von *CHLAMYDOMONAS REINHARDII*.

Bei einer Konzentration von 25 mM Mg^{2+} , wie sie im Isolationsmedium vorliegt, treten im Ribosomenmuster von *CHLAMYDOMONAS REINHARDII* im wesentlichen nur zwei Peaks auf, der cyto-

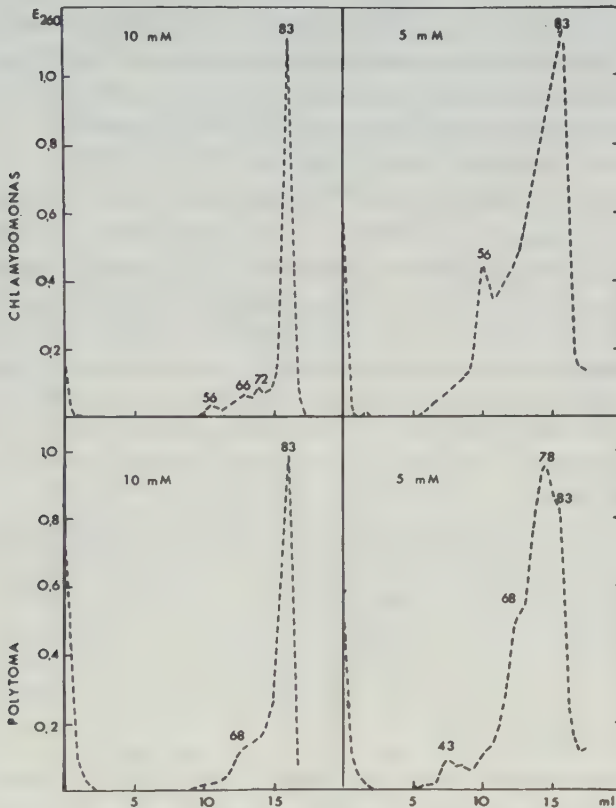


Abb. 21

Einfluß der Mg^{2+} -Konzentration auf das Ribosomenmuster von *CHLAMYDOMONAS REINHARDII* und *POLYTOMA MIRUM*

Die Reduktion der Mg^{2+} -Konzentration auf 10 mM (A) bzw. 5 mM (B) führt bei *CHLAMYDOMONAS* zu einer selektiven Abnahme des S-Wertes plastidärer Ribosomen. Die Ribosomenmuster von *POLYTOMA* bei 10 mM (C) bzw. 5 mM (D) lassen keine plastidären Partikel erkennen.

plasmatische 83 S und der plastidäre 72 S (Abb. 13, Seite 39). Die schrittweise Reduzierung der Mg^{2+} -Konzentration hat eine kontinuierliche Abnahme des S-Wertes der plastidären Ribosomen zur Folge, während die Sedimentationskonstante der cytoplasmatischen Ribosomen zunächst unverändert bleibt.

Bei 10 mM Mg^{2+} (Abb. 21 A) treten neben 66 S- und 56 S-Partikel noch 72 S-Ribosomen auf. Dieses unterschiedliche Sedimentationsverhalten spricht für eine Heterogenität der plastidären Ribosomen von *CHLAMYDOMONAS REINHARDII*. Die quantitative Auswertung dieses Ribosomenmusters zeigt, daß der cytoplasmatische Anteil unverändert 64 % beträgt, während auf die plastidären Ribosomenklassen insgesamt 36 % entfallen.

Eine Verringerung der Mg^{2+} -Konzentration auf 5 mM führt zur weiteren Abnahme des S-Wertes aller plastidären Partikel (Abb. 21 B). Der heterogene Charakter ist in diesem Konzentrationsbereich nicht mehr so stark ausgeprägt, so daß der Hauptanteil bei 56 S sedimentiert. Der horizontale Verlauf der Kurve im 60 S-Bereich wird von den restlichen plastidären Ribosomen gebildet, deren S-Wert noch nicht vollständig reduziert ist. Mit 65 % ist der Betrag der cytoplasmatischen Ribosomen weiterhin unverändert. Auf die plastidären Ribosomen entfallen insgesamt 35 %.

Die Konzentration von 5 mM Mg^{2+} stellt bei *CHLAMYDOMONAS* genau die Grenzkonzentration dar, bei der die plastidären Partikel noch nicht dissoziieren. Unterhalb von 5 mM kommt es zum Zerfall der plastidären Ribosomen in die beiden Untereinheiten, während die 83 S noch intakt bleiben. Bei 1 mM Mg^{2+} erfolgt schließlich ein Dissoziieren der cytoplasmatischen Ribosomen (HOOBER und BLOBEL 1969).

Im Ribosomenmuster von *POLYTOMA MIRUM* tritt bei 25 mM Mg^{2+} nur der cytoplasmatische 83 S-Peak auf (Abb. 16, Seite 45, Tab. 2). Die Frage nach der Existenz plastidärer Ribosomen sollte anhand des unterschiedlichen Sedimentationsverhaltens von 72 S- und 83 S-Ribosomen in Abhängigkeit von der Mg^{2+} -Konzentration überprüft werden.

Die kontinuierliche Erniedrigung der Molarität führt erstmalig bei 10 mM Mg^{2+} (Abb. 21 C) zu einer veränderten Ribosomenkurve, wie das Auftreten der Schulter bei 68 S zeigt. Da die

Ribosomenklasse [S]	Mg ²⁺ - Molarität				
	25 mM	10 mM	5 mM	2 mM	0.5 mM
83	100	91	30	16	
78			43		
68		9	20	49	67
56				20	
43			7	15	33

Tab. 2

Quantitative Verteilung der Ribosomen von POLYTOMA MIRUM bei unterschiedlicher Mg²⁺-Konzentration

Die Reduktion der Mg²⁺-Konzentration von 25 mM auf 0.5 mM führt über Zwischenstufen zum völligen Dissoziieren der cytoplasmatischen Ribosomen in die beiden Untereinheiten: 68 S und 43 S.

Reduktion der Mg²⁺-Konzentration selektiv zur Abnahme der S-Werte der plastidären Ribosomen führt (Abb. 21 A und B, Seite 55), kann es sich hier um eine geringe Menge (9 %, Tab. 2) von 70 S-Ribosomen handeln, die umgekehrt bei höheren Mg²⁺-Konzentrationen (25 mM) große S-Werte haben und deshalb von den cytoplasmatischen Ribosomen nicht getrennt werden können. Diese Hypothese wird jedoch durch den Kurvenverlauf bei 5 mM Mg²⁺ widerlegt (Abb. 21 D, Seite 55). Die Mg²⁺-Reduzierung hat keine kontinuierliche Abnahme des S-Wertes zur Folge, wie es für Ribosomen der 70 S-Fraktion charakteristisch ist. Im Gegenteil, der Anteil an 68 S-Partikeln verdoppelt sich auf 20 % (Tab. 2). Dieses unveränderte Sedimentationsverhalten wird dann verständlich, wenn man die drastische Abnahme der 83 S-Ribosomen (30 %, Tab. 2) und das Auftreten ribosomaler Partikel bei 43 S betrachtet. Die ursprünglich als plastidäre Ribosomen diskutierten 68 S-Partikel (Abb. 21 C, Seite 55) sind in Wirklichkeit Dissoziationsprodukte der cytoplasmatischen Ribosomen.

Diese Vorstellung kann durch weitere Reduzierung der Mg^{2+} -Konzentration bestätigt werden (Tab. 2). Die Abnahme der 83 S-Ribosomen auf 16 % bei 2 mM Mg^{2+} führt zu einem Ansteigen der 68 S-Untereinheiten auf 49 % und zur Erhöhung des 43 S-Anteils auf 15 %. Bei 0.5 mM Mg^{2+} sind die cytoplasmatischen Ribosomen vollständig dissoziiert. Als Untereinheiten finden wir 68 S-Ribosomen (67 %) und 43 S-Ribosomen (33 %).

Das Auftreten von 78 S- und 56 S-Partikeln deutet nicht auf neue Ribosomenklassen hin, sondern erklärt sich durch die Tatsache, daß der S-Wert ribosomaler Partikel von der Ionenstärke und damit auch von der Mg^{2+} -Konzentration wie folgt abhängt: Der S-Wert eines Partikels erniedrigt sich um so mehr, je kleiner die Ionenkonzentration wird (RODGERS 1964, WELLER und HOROWITZ 1964, GESTELAND 1966). Der 78 S-Peak leitet sich somit von den cytoplasmatischen Ribosomen ab, während die 56 S-Fraktion der 43 S-Untereinheit zugeordnet werden muß.

Diese Ergebnisse zeigen, daß POLYTOMA MIRUM keine nachweisbaren Mengen plastidärer Ribosomen besitzt, die sich in ihrem S-Wert von den cytoplasmatischen Ribosomen kaum unterscheiden oder gar übereinstimmen. Die Versuchsergebnisse mit Rifampicin sind damit bestätigt.

Ein Vergleich der Ribosomenkurven von CHLAMYDOMONAS REINHARDII und POLYTOMA MIRUM (Abb. 21 B und D, Seite 55) weist auf das unterschiedliche Verhalten der cytoplasmatischen Ribosomen gegenüber der Mg^{2+} -Reduktion hin. Bei 5 mM Mg^{2+} dissoziieren bereits die 83 S-Partikel von POLYTOMA MIRUM, während bei CHLAMYDOMONAS REINHARDII selbst die plastidären Ribosomen noch intakt sind. Die Ribosomen von POLYTOMA MIRUM sind offensichtlich gegenüber dem Einfluß der Mg^{2+} -Konzentration empfindlicher als die Partikel von CHLAMYDOMONAS REINHARDII.

5. Zusammenfassung

Vergleichende Versuche mit den Isolationsmethoden von GALLING (1968) sowie HOOBER und BLOBEL (1969) führten zur Entwicklung eines neuen Verfahrens, das die Vorzüge der einzelnen Methoden vereint. Zur Auftrennung der ribosomalen Präparation führten wir den Ausschwingrotor SW 27.1 ein, der eine maximale Trennstrecke besitzt und gleichzeitig das Arbeiten mit kleinen Ribosomenmengen gestattet.

Als Referenz zur Berechnung der S-Werte sowie zur Identifizierung des plastidären Peaks benutzten wir E. COLI-Ribosomen, die unter diesen Bedingungen 72 S haben bzw. in Untereinheiten von 50 S und 30 S dissoziieren. Die quantitative Auswertung der Ribosomenkurven erfolgte nach einem mathematischen Näherungsverfahren, das die Berechnung auch sich überschneidender Kurvenflächen erlaubt.

Bei CHLAMYDOMONAS REINHARDII läßt sich eine Beziehung zwischen Ausbeute an 72 S-Ribosomen und Zellzahl nachweisen. Zelldichten von $1.8 - 2.3 \times 10^6$ Zellen/ml erweisen sich am günstigsten. Die quantitative Auswertung des Ribosomenmusters bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 25 mM ergibt folgende Werte: Die cytoplasmatischen 83 S-Ribosomen stellen mit 61 % den Hauptanteil dar. Auf die plastidären 72 S-Ribosomen entfallen 34 %. Ribosomale Untereinheiten im 66 S- und 41 S-Bereich sind in unbedeutendem Maße vertreten und belaufen sich auf maximal 5 %. Diese Verteilung ist bei vergleichbarer Zelldichte unabhängig von der Anzuchtmethode.

Der Einfluß von Rifampicin auf Wachstum und Ribosomensynthese phototroph kultivierter CHLAMYDOMONAS-Zellen wurde untersucht. 250 µg/ml Rifampicin wirken letal. 200 µg/ml Antibiotikum führen nach einer Inkubationsdauer von 48 Std. zu einer starken Reduktion der Zelldichte. Unter diesen Bedingungen sind mit der Gradientenzentrifugation keine plastidären Ribosomen mehr nachweisbar, während der 83 S-Anteil unverändert bleibt.

Das unterschiedliche Sedimentationsverhalten der 72 S- und 83 S-Ribosomen in Abhängigkeit von der Mg^{2+} -Konzentration wurde untersucht. Bei 25 mM Mg^{2+} treten nur die plastidären und cytoplasmatischen Partikel in Erscheinung. Die Reduzierung der Mg^{2+} -Konzentration auf 10 mM führt zur selektiven Abnahme des S-Wertes plastidärer Ribosomen. Dieses Verhalten ist durch verschiedene Übergangswerte charakterisiert und spricht für die Heterogenität der 72 S-Partikel von CHLAMYDOMONAS REINHARDII. 5 mM Mg^{2+} kann als Grenzkonzentration bezeichnet werden, bei der plastidäre Ribosomen noch nicht dissoziieren. Unterhalb dieser Konzentration kommt es zum Zerfall der 72 S-Partikel in die Untereinheiten, während die 83 S-Ribosomen noch intakt bleiben. Die cytoplasmatischen Ribosomen dissoziieren erst bei 1 mM Mg^{2+} .

Das Ribosomenmuster von POLYTOMA MIRUM zeigt nach einfacher Gradientenzentrifugation nur einen Peak der 83 S-Ribosomen. Es sollte deshalb die grundsätzliche Frage geklärt werden, ob plastidäre Ribosomen bei POLYTOMA MIRUM vorkommen.

Die vorhandene UV-Absorption im 70 S-Bereich schließt diese Möglichkeit nicht aus. Durch Anreicherung dieses S-Bereiches konnten 72 S-Ribosomen nachgewiesen werden. Die ausgesprochen geringe Menge dieser Partikel läßt vermuten, daß es sich in diesem Fall auch um mitochondriale Ribosomen handeln könnte.

Der direkte Beweis für die eine oder andere Möglichkeit konnte aus experimentellen Gründen nicht geführt werden. Deshalb versuchten wir, durch Ausschlußverfahren zu bestätigen, daß ein Vorhandensein plastidärer Ribosomen nur im 70 S-Bereich zu diskutieren ist.

Das Antibiotikum Rifampicin, das - wie die Versuche mit CHLAMYDOMONAS REINHARDII zeigten - selektiv die plastidäre Ribosomensynthese hemmt, gab uns die Möglichkeit, die Frage nach der Existenz anderer Ribosomenklassen im Plastiden von POLYTOMA MIRUM zu überprüfen. Das Ribosomenmuster Rifampicin-behandelter Zellen unterscheidet sich nicht von der Kontrolle. Das Vorhandensein anderer Ribosomenklassen in nachweisbaren Mengen kann somit ausgeschlossen werden.

Als weitere Möglichkeit zur Identifizierung plastidärer Ribosomen benutzten wir den Einfluß der Mg^{2+} -Konzentration auf das Sedimentationsverhalten. Die Ribosomenkurven bei 10 mM Mg^{2+} und 5 mM Mg^{2+} lassen keine plastidären Partikel erkennen. Dieser Befund bestätigt die Versuchsergebnisse mit Rifampicin.

C. Extraktion der Nucleinsäuren und elektrophoretische Auftrennung der ribosomalen RNA von CHLAMYDOMONAS REINHARDII und POLYTOMA MIRUM

1. Charakterisierung des RNA-Musters von CHLAMYDOMONAS REINHARDII

Ribosomen bauen sich aus Untereinheiten auf, die ihrerseits aus Proteinen und ribosomaler RNA bestehen. Der S-Wert der einzelnen RNA-Arten ist für Untereinheiten und Ribosomentypen spezifisch. Plastidäre 72 S-Partikel enthalten 23 S- und 16 S-r-RNA, während sich die cytoplasmatischen 83 S-Ribosomen durch die 25 S-

sowie 18 S-r-RNA auszeichnen (STUTZ und NOLL 1967, LOENING und INGLE 1967).

Diese unterschiedliche RNA-Zusammensetzung war eine weitere Möglichkeit der Identifizierung plastidärer Ribosomen von POLYTOMA MIRUM. Die gelelektrophoretische Untersuchung von r-RNA erschien uns auch insofern besonders wichtig, weil sich diese Methode im Vergleich zur Gradientenzentrifugation auf völlig andere Kriterien stützt. Darüber hinaus war die Möglichkeit gegeben, daß dieses Verfahren eine verbesserte Nachweisgrenze besitzt.

Zur Ausarbeitung der Methode führten wir die Versuche zunächst mit CHLAMYDOMONAS REINHARDII durch, weil hier das r-RNA-Profil bereits bekannt ist (HOOBER und BLOBEL 1969, BOURQUE et al. 1971). Dabei zeigt sich, daß die Isolierung hochmolekularer r-RNA durch verschiedene Faktoren beeinträchtigt wird. Aufschlußmethode, Aufbereitung der Nucleinsäuren sowie Zusatz von Nucleasen-Inhibitoren beeinflussen die Intaktheit der RNA stark.

Das Aufschließen der CHLAMYDOMONAS-Zellen mit der French-Pressure erweist sich als ungeeignet. Die RNA-Präparationen sind durch vermehrtes Auftreten von degradierten Nucleinsäuren gekennzeichnet. Offenbar ist diese Aufschlußmethode nur dann erfolgreich, wenn man die Ribosomen isoliert und erst daraus die r-RNA extrahiert (HOOBER und BLOBEL 1969). Im Einklang mit diesen Überlegungen steht das Isolierungsverfahren von BOURQUE et al. (1971), die ebenfalls diese Aufschlußmethode umgehen und die Extraktion der Nucleinsäuren aus ganzen Zellen durchführen. Gute Ergebnisse liefert der Zellaufschluß mit der Bühler-Mühle (SSYMANK, persönl. Mitteilung), der im Folgenden bei CHLAMYDOMONAS Anwendung findet.

Zur Aufarbeitung des Homogenats benutzten wir die modifizierte Phenol-Methode von KIRBY (1965). Tri-isopropyl-naphthalinsulfonsäure-Na erwies sich als guter Nucleasen-Inhibitor. Die elektrophoretische Auftrennung der so gewonnenen RNA-Präparationen ist in Abb. 22 dargestellt.

Die scharfen Banden der cytoplasmatischen 25 S- sowie 18 S-r-RNA sprechen dafür, daß die hochmolekulare Struktur dieser Partikel während der Isolation erhalten bleibt. Die plastidäre 16 S-r-RNA zeigt ebenfalls keine Abbauprodukte,

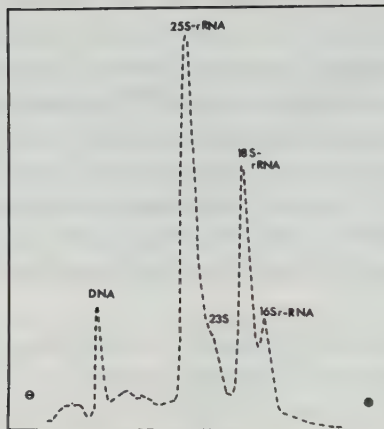


Abb. 22

r-RNA-Muster von CHLAMYDOMONAS REINHARDII

Die 25 S- sowie 18 S-r-RNA sind cytoplasmatischen Ursprungs, während die 23 S- und 16 S-r-RNA den plastidären Ribosomen zugeordnet werden. Der Abbau der plastidären 23 S-r-RNA ist deutlich ausgeprägt.

während die 23 S-r-RNA deutlich degradiert ist. Dieser Abbau der plastidären 23 S-r-RNA von CHLAMYDOMONAS REINHARDII ist bei verschiedenen Isolationsmethoden unterschiedlich stark ausgeprägt, jedoch grundsätzlich immer vorhanden (LOENING 1968, BOURQUE et al. 1971, LEAVER und INGLE 1971). Darüber hinaus ist dieses Phänomen auch bei Arbeiten mit anderen Objekten mehrfach beschrieben worden (WOODCOCK und BOGORAD 1970, RAWSON et al. 1971, SCHUIT et al. 1970, KOCHERT und SANSING 1971, VEDEL und D'AOUST 1970).

Nach Abschluß unserer Untersuchungen wurde von CATTOLICO und JONES (1972) eine neue Methode zur Isolierung stabiler und hochmolekularer RNA veröffentlicht. Die Autoren konnten zeigen, daß ihre RNA-Präparationen von CHLAMYDOMONAS weder Abbauprodukte in Form von niedermolekularen r-RNA-Bruchstücken noch Nucleasen enthielten. Die Entwicklung dieser Präparationsmethode stellt zumindest bei CHLAMYDOMONAS einen wesentlichen Fortschritt in der elektrophoretischen Untersuchung der r-RNA dar.

2. RNA-Untersuchungen bei unbehandelten sowie Rifampicin-inkubierten POLYTOMA-Zellen

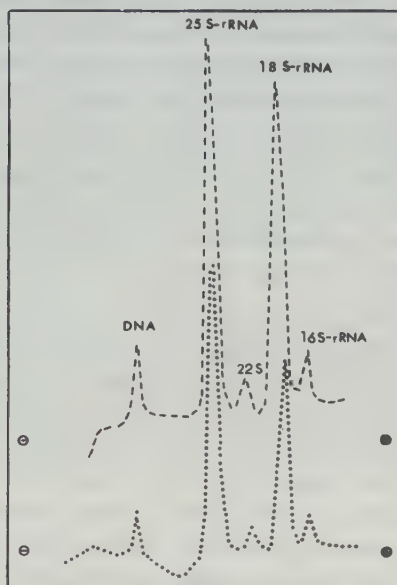


Abb. 23

r-RNA-Muster unbehandelter POLYTOMA-Zellen sowie unter Rifampicin-Einfluß

Das r-RNA-Muster unbehandelter Zellen von POLYTOMA MIRUM (---) zeichnet sich durch das Auftreten cytoplasmatischer 25 S- und 18 S-r-RNA aus sowie durch das Vorhandensein von r-RNA-Fraktionen im 22 S- und 16 S-Bereich. Die Synthese dieser r-RNA-Typen läßt sich durch Rifampicin nicht nennenswert beeinflussen (...).

Die Isolierungsmethode, die wir bei CHLAMYDOMONAS entwickelten, konnte bei POLYTOMA MIRUM dann erfolgreich angewandt werden, wenn wir zum Zellaufschluß nicht die Bühler-Mühle, sondern die French-Pressure benutzten. Das RNA-Profil unbehandelter POLYTOMA-Zellen ist in Abb. 23 wiedergegeben. Die beiden Hauptmaxima stimmen mit den Befunden bei CHLAMYDOMONAS (Abb. 22, Seite 62) überein und haben S-Werte von 25 bzw. 18. Sie müssen

somit den cytoplasmatischen Ribosomen zugeordnet werden.

Die beiden kleineren Peaks errechnen sich durch lineare Extrapolation als 22 S- und 16 S-r-RNA. Die 16 S-Komponente ist eindeutig mit der entsprechenden plastidären Fraktion von *CHLAMYDOMONAS* identisch, während der S-Wert der höhermolekularen r-RNA abweicht. Ein gewisser Abbau der 22 S-r-RNA scheint aufgrund der relativ kleinen Fläche auch hier gegeben zu sein.

Als wesentliches Ergebnis bleibt festzuhalten, daß das Auftreten von 22 S- und 16 S-r-RNA für ein grundsätzliches Vorhandensein von 72 S-Ribosomen spricht. Aussage darüber, ob es sich um plastidäre oder mitochondriale Partikel handelt, hoffen wir durch Rifampicin-Versuche machen zu können.

Die Kulturen wurden entweder 24 Std. mit 120 µg/ml oder während der gesamten Wachstumsphase mit 100 µg/ml Rifampicin inkubiert. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA zeigte keine Unterschiede zwischen den beiden Rifampicin-Konzentrationen bzw. Inkubationszeiten. In Abb. 23 ist das RNA-Muster von *POLYTOMA MIRUM* nach Inkubation mit 120 µg/ml Rifampicin (24 Std.) wiedergegeben. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen treten hier dieselben RNA-Typen wieder auf. Dies war insofern unerwartet, weil diese Banden im Falle des plastidären Ursprungs der 22 S- und 16 S-r-RNA aufgrund der Inkubation mit Rifampicin hätten verschwinden müssen.

Zur Erklärung dieses überraschenden Ergebnisses kann man folgende Überlegungen anführen. Zunächst könnte man grundsätzlich eine Unwirksamkeit des Antibiotikum diskutieren. Dagegen spricht die Beeinflussung des Wachstums durch das Antibiotikum. Zum anderen konnte man bisher nur in einem Fall, nämlich bei höheren Pflanzen, eine Unwirksamkeit von Rifampicin gegenüber der plastidären DNA-abhängigen RNA-Polymerase nachweisen (BOTTOMLEY et al. 1971). Untersuchungen bei der verwandten Gattung *CHLAMYDOMONAS* (SURZYCKI 1969, LEVINE et al. 1970, GOODENOUGH et al. 1971) sowie anderen Grünalgen (GALLING 1971, BROWN et al. 1968) führten stets zu einer Hemmung der plastidären RNA-Synthese unter dem Einfluß von Rifampicin.

Zu einer plausiblen Interpretation der RNA-Kurven gelangen wir, wenn die quantitative Auswertung in die Betrachtungen einbezogen wird. Die Berechnung des 22 S- und 16 S-r-RNA-Anteils

ergibt, daß bei konstanten Mengen an cytoplasmatischer r-RNA die 22 S- bzw. 16 S-Fraktion um 2 % gegenüber der Kontrolle reduziert ist. Diese Abnahme während der Rifampicin-Inkubation ist aber deutlich kleiner als die Reproduzierbarkeit der Methode, die bei etwa ± 5 % liegt. Andererseits beträgt der Anteil der 22 S- und 16 S-Partikel im RNA-Muster unbehandelter POLYTOMA-Zellen nicht mehr als jeweils 5 %. Somit ist eine Veränderung plastidärer Ribosomen bezüglich der Quantität nicht erfaßbar, da der Rifampicin-Effekt von der Schwankungsbreite der Methode überlagert wird. Daraus folgt, daß eventuelles Vorhandensein von plastidären Ribosomen sich auf eine extrem geringe Menge beschränken muß.

Die Frage nach dem Ursprung dieser RNA-Typen kann damit nicht beantwortet werden. Wesentlicher aber erscheint das Ergebnis, das die Existenz von 72 S-Ribosomen grundsätzlich fordert und den Befund des Anreicherungsversuches (Abb. 17, Seite 47) bestätigt. Beide Ergebnisse können aber keine Aussage darüber machen, ob es sich um plastidäre oder mitochondriale Ribosomen handelt.

3. Zusammenfassung

Das RNA-Muster von CHLAMYDOMONAS REINHARDII ist gekennzeichnet durch die beiden Hauptmaxima der cytoplasmatischen 25 S- und 18 S-r-RNA, sowie durch die kleineren Peaks der plastidären 23 S- und 16 S-r-RNA. Die entwickelte Isolierungsmethode kann ebenso wie die Verfahren anderer Autoren den Abbau der 23 S-r-RNA nicht verhindern.

Im RNA-Profil von POLYTOMA MIRUM sind die cytoplasmatischen 25 S- und 18 S-r-RNA sowie ribosomale 22 S- und 16 S-Fraktionen nachweisbar. Eine Identifizierung dieser Fraktionen als plastidäre r-RNA-Partikel kann durch die Rifampicin-Versuche nicht nachgewiesen werden. Es wird die Möglichkeit diskutiert, daß der geringe Rifampicin-Effekt nicht auf die Unwirksamkeit des Antibiotikums, sondern auf das Vorhandensein ausgesprochen kleiner Mengen plastidärer Ribosomen zurückzuführen ist. Diese Hypothese stützt sich auf die Tatsache, daß das Auftreten der 22 S- und 16 S-r-RNA die Existenz von 72 S-Ribosomen fordert.

D. DNA-Extraktion und Charakterisierung durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation bei POLYTOMA MIRUM

1. DNA aus ganzen Zellen

Alle lebenden Organismen besitzen als Träger der Erbsubstanz die DNA. Sie codiert die Information für die Bildung der m-, t- und r-RNA. Diese Wechselbeziehung zwischen DNA und RNA erweist sich im Pflanzen- und Tierreich als universell gültiges Modell.

Algen und grünen Pflanzen muß man bei Betrachtung unter diesem Gesichtspunkt insofern eine gewisse Sonderstellung einräumen, weil sie sich im Gegensatz zu den plastidenfreien tierischen Zellen durch das Vorhandensein von drei derartigen genetischen Systemen auszeichnen: Kern, Plastid und Mitochondrien.

Während die Codierung aller RNA-Arten des Cytoplasmas durch die Kern-DNA nachgewiesen ist, kann man analoge Verhältnisse hinsichtlich der Organellen noch nicht voll bestätigen.

Mit Sicherheit weiß man, daß zumindest einige t-RNA-Typen und die r-RNA der Organellen-Ribosomen durch Transcription der Organellen-DNA gebildet werden (u. a. SCOTT und SMILLIE 1967, STUTZ und RAWSON 1970, TEWARI und WILDMAN 1968, FUKUHARA et al. 1969, WINTERSBERGER und VIEHHAUSER 1968, WOOD und LUCK 1969). Da in allen bisher untersuchten Fällen eine Hybridisierung der r-RNA der 70 S-Ribosomen vornehmlich mit der Organellen-DNA und nur in unbedeutendem Maße mit der Kern-DNA erfolgte, darf man die Codierung der r-RNA der Organellen-Ribosomen durch die Organellen-DNA als universell gültig annehmen.

In Bezug auf unsere Problemstellung hat diese Aussage folgende Konsequenz: Plastidäre Ribosomen können nur dann anwesend sein, wenn eine Plastiden-DNA vorhanden ist. Die Existenz einer Plastiden-DNA ist also die Voraussetzung für das Vorkommen von plastidären Ribosomen. Ein Vorhandensein der Plastiden-DNA darf jedoch nicht als Beweis für die Existenz plastidärer Ribosomen gelten, da trotz Erfüllung dieser Voraussetzung für die Bildung der ribosomalen Partikel das Auftreten von plastidären Ribosomen nicht zwingend ist. Das Fehlen einer Plastiden-DNA dagegen

hat zur Folge, daß in diesem Fall mit Sicherheit keine plastidären Ribosomen vorhanden sein können.

Aufgrund dieser Überlegungen zielten unsere weiteren Untersuchungen darauf ab, die Anwesenheit einer Plastiden-DNA in POLYTOMA MIRUM zu prüfen.

Eine klare und eindeutige Antwort auf diese Frage kann von der experimentellen Seite nur durch die Organellenisolierung gegeben werden. Diese Methode scheitert aber an der großen Labilität des Plastiden von POLYTOMA MIRUM gegenüber jedem mechanischen Zellaufschluß. Dies ist nicht verwunderlich, wenn man die zerklüftete und lappige Gestalt des Plastiden sowie das Fehlen intraplastidärer Strukturen betrachtet (Abb. 1, Seite 5).

Eine wesentliche Verbesserung wäre dann gegeben, wenn man von den Protoplasten ausgehen könnte. Aber alle Versuche, mit einem aus Schnecken isolierten Enzym (Helicase) Protoplasten zu gewinnen, waren erfolglos. Die Möglichkeit der Organellenisolierung ist somit zunächst gegenstandslos.

Als Alternative bot sich die DNA-Extraktion aus ganzen Zellen an. Zunächst charakterisierten wir das DNA-Muster der POLYTOMA-Zelle, um dann durch indirekte Beweisführung die Möglichkeit der Existenz einer Plastiden-DNA zu diskutieren.

Zur Gewinnung der DNA aus ganzen Zellen wurden die Methoden von MARMUR (1961) sowie CHIANG und SUEOKA (1967) modifiziert. Die Anwendung zweier verschiedener Methoden ist zur Ausschaltung unbeachtet gebliebener Fehlerquellen sinnvoll.

In Abb. 24 ist das DNA-Muster von POLYTOMA MIRUM nach CHIANG und SUEOKA wiedergegeben. Auffallend an dieser DNA-Verteilung ist die Tatsache, daß das Vorkommen von DNA nicht auf eine einzige Bande beschränkt ist. Die α -Bande mit einer Dichte von $1716 \text{ (g/cm}^3\text{)}$ wird aufgrund der Quantität der Kern-DNA zugeordnet. Die β - und γ -Banden liegen sehr dicht beisammen und haben eine Dichte von $1703 \text{ (g/cm}^3\text{)}$ bzw. $1699 \text{ (g/cm}^3\text{)}$. Eine eindeutige Identifizierung dieser DNA-Banden, deren Anteil am DNA-Profil von POLYTOMA MIRUM ungefähr 20 % beträgt, ist aufgrund dieser Versuchsanordnung nicht möglich. Der Gedanke, daß es sich um Plastiden- und Mitochondrien-DNA handeln könnte, liegt nahe. Die Identifizierung der beiden Banden als Satelliten-DNA

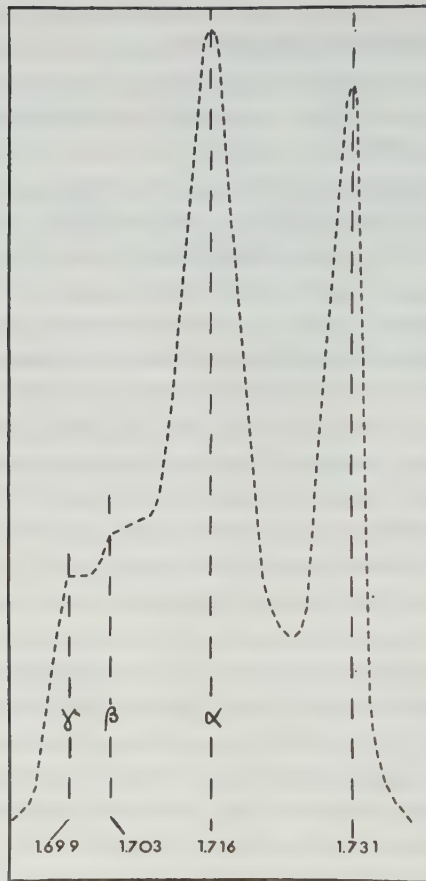


Abb. 24

DNA-Muster von POLYTOMA MIRUM

Die DNA wurde aus ganzen Zellen nach der Methode von CHIANG und SUEOKA extrahiert und durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Als Referenz dient *Micrococcus luteus*-DNA mit einer Dichte von 1.731 (g/cm³). Für die Kern-DNA (= α -Bande) von POLYTOMA MIRUM ergibt sich eine Dichte von 1.716 (g/cm³). Die β-Bande bzw. γ -Bande haben Werte von 1.703 bzw. 1.699 (g/cm³).

des Kerns erscheint insofern unwahrscheinlich, weil ein Vorkommen dieses DNA-Typs weder bei der verwandten Gattung CHLAMYDOMONAS noch bei anderen Vertretern der Gattung POLYTOMA nachgewiesen werden konnte (KIERAS und CHIANG 1971).

Ein Vergleich mit dem Isolierungsverfahren nach MARMUR (1961) zeigt, abgesehen von der geringfügigen verbesserten Auftrennung der β - und γ -Banden, keine signifikanten Unterschiede und stellt somit eine Bestätigung des CHIANG-SUEOKA-Verfahrens dar. Nachdem dieser Befund durch wiederholte Versuche abgesichert werden konnte, führten wir die weiteren DNA-Extraktionen nur nach dem CHIANG-SUEOKA-Verfahren durch, das wesentlich rationeller gestaltet ist.

α	β	γ
1,716	1,704	1,699
1,717	1,703	1,698
1,715	1,703	1,699
1,716	1,702	1,698
1,716	1,703	1,700
1,717	1,704	1,701
1,716	1,703	1,699

Tab. 3

Gefundene Dichtewerte (g/cm^3) für die α -, β - und γ -Bande

Die angegebenen Dichtewerte wurden aus 7 DNA-Präparationen ermittelt. Als arithmetische Mittelwerte und zugleich Häufigkeitswerte ergeben sich für die α -, β - und γ -Bande die Dichten von 1.716, 1.703 und 1.699 (g/cm^3).

In Tab. 3 sind die Ergebnisse von sieben DNA-Präparationen zusammengestellt. Die Berechnung der Dichten der einzelnen Komponenten erfolgt nach Auftrennung durch analytische CsCl -Dichtegradientenzentrifugation anhand des Ultrazentrifugenscans. Als Referenz benutzten wir *Micrococcus luteus*-DNA, die eine Dichte von 1.731 (g/cm^3) besitzt.

Für die α -Bande (= Kern-DNA) ergibt sich ein arithmetischer Mittelwert von 1.716 (g/cm^3). Wie aus der Tabelle ersicht-

lich, entspricht dieser Dichtewert zugleich dem Häufigkeitswert der α -Bande. Die Übereinstimmung zwischen arithmetischem Mittelwert und Häufigkeitswert gilt auch für die β - und γ -Bande, die Dichten von $1.703 \text{ (g/cm}^3\text{)}$ bzw. $1.699 \text{ (g/cm}^3\text{)}$ aufweisen. Diese Daten dokumentieren die ausgesprochen gute Reproduzierbarkeit der Methode, die von keinem vergleichbaren Verfahren erreicht wird.

Nach der empirischen Gleichung von SCHILDKRAUT, MARMUR und DOTY (1962) (siehe Seite 21,22) kann man aufgrund der Dichte auch Aussagen über den Gehalt an GC-Basenpaaren machen. Die Auswertung ergibt für die Kern-DNA 57.2 Mol-% GC, für die β -Bande 43.8 Mol-% GC und für die γ -Bande 39.8 Mol-% GC.

Vergleicht man diese Ergebnisse bei POLYTOMA MIRUM mit den Daten bei KIERAS und CHIANG (1971) für POLYTOMA UVELLA und POLYTOMA OBTUSUM, so treten signifikante Unterschiede hinsichtlich der Dichten und der Anzahl der DNA-Banden auf. Die Autoren geben für die α -Bande eine Dichte von $1.710 \text{ (g/cm}^3\text{)}$ an und finden nur eine weitere Bande, die bei $1.681 \text{ (g/cm}^3\text{)}$ bzw. $1.683 \text{ (g/cm}^3\text{)}$ liegt. Die Beurteilung dieser unterschiedlichen Ergebnisse erfolgt im Kapitel Diskussion.

2. Mitochondrienisolation und Extraktion der Mitochondrien-DNA

Während die α -Bande des DNA-Musters von POLYTOMA MIRUM (Abb. 4, Seite 25) der Kern-DNA zugeordnet wird, kann man über die Identifizierung der β - und γ -Bande keine klaren Aussagen machen. Als Anhaltspunkt dienen die Angaben von PARTHIER (1970), der repräsentative Dichtewerte der Mitochondrien- und Plastiden-DNA angibt. Für die Mitochondrien-DNA aus verschiedenen Organismen ist der Dichtebereich von $1.702 - 1.706 \text{ (g/cm}^3\text{)}$ charakteristisch, während die Plastiden-DNA aus einer großen Auswahl von Pflanzen eine Dichte von $1.695 - 1.698 \text{ (g/cm}^3\text{)}$ besitzt. Aufgrund dieser Daten ist die Zuordnung der β -Bande bzw. γ -Bande als Mitochondrien- bzw. Plastiden-DNA theoretisch denkbar.

Zur experimentellen Bestätigung dieser Vorstellung war die Organellenisolierung verbunden mit der DNA-Extraktion notwendig. Dieser Versuch ließ sich mit dem Plastiden aufgrund seiner Morphologie nicht durchführen und mußte deshalb auf die Mitochondrien beschränkt bleiben.

Der Anteil der Mitochondrien-DNA an der Gesamtzell-DNA ist sehr gering. Deshalb ist die Anzucht von Massenkulturen

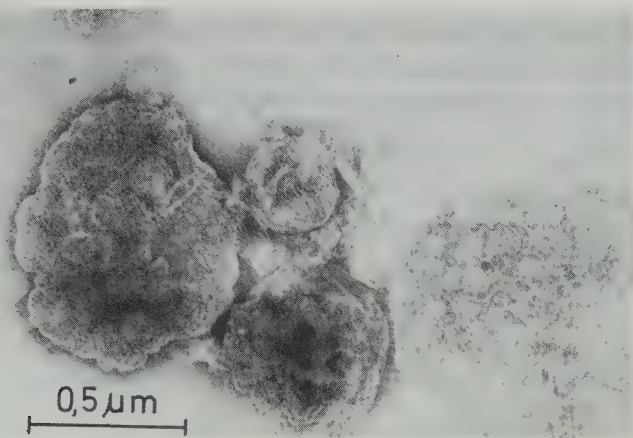


Abb. 25

Isolierte Mitochondrien durch Negativ-staining dargestellt

Die Mitochondrien werden mit Uranylacetat kontrastiert und auf ein Kohle-bedampftes Kupfernetz gebracht. Im Elektronen-Mikroskop geben sich die Mitochondrien durch ihre typischen Cristae zu erkennen.

(35 - 60 Liter) erforderlich. Zum Zellaufschluß eignet sich die French-Pressure mit einem Druck von 1000 - 2000 (lb/inch²). Die Isolierung der Mitochondrien aus dem Zellhomogenat erfolgt durch fraktionierende Zentrifugation. Die elektronenmikroskopische Untersuchung verschiedener Fraktionen zeigt, daß der Hauptanteil intakter Mitochondrien bei 5000 x g sedimentiert. Die Identifizierung dieses Sediments als Mitochondrienfraktion wird durch Abb. 25 dokumentiert.

Zur Gewinnung der Mitochondrien-DNA aus dieser Fraktion benutzen wir verschiedene Verfahren. Das Ziel dieser Methode besteht darin, kontaminierende Kern-DNA schonend zu entfernen.

Während die Reinigung der Mitochondrien durch Saccharose-Gradientenzentrifugation (YU et al. 1972) keine befriedigenden Ergebnisse liefert, erweist sich die Behandlung mit DNase (EC 3.1.4.5) als sehr erfolgreich. Die Inkubation der Mitochondriensuspension mit 50 μg/ml DNase bei 25°C, 30 Min. (TEWARI et al. 1966) oder mit 100 μg/ml DNase bei 0°C, 30 Min. eignet sich am besten. Diese enzymatische Behandlung der Mitochondrien erfordert intakte Organellen, deren unbeschädigte Doppelmembran

die Mitochondrien-DNA vor dem Abbau schützt. Kaputte Mitochondrien, wie sie im Sediment bei 10000 x g enthalten sind, besitzen nach der DNase-Inkubation keine DNA mehr.

In Abb. 26 ist eine mitochondriale DNA-Präparation nach

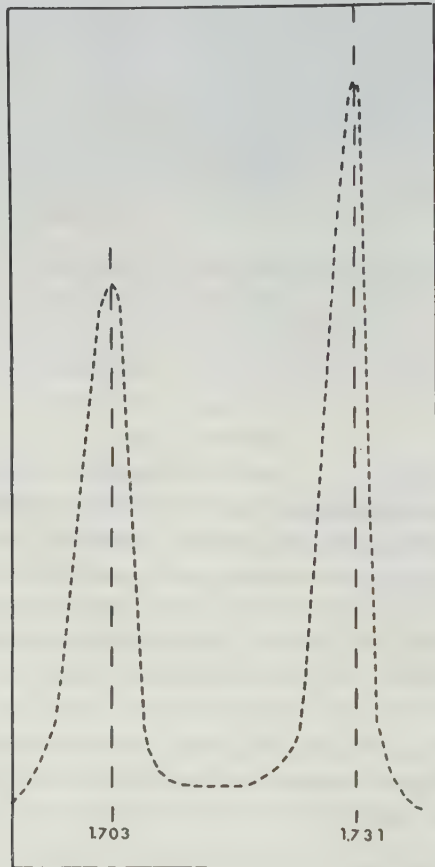


Abb. 26

Mitochondrien-DNA aus isolierten Organellen

Aus den isolierten Mitochondrien wird nach DNase-Behandlung die DNA extrahiert. Die Auftrennung durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation ergibt für die Mitochondrien-DNA eine Dichte von 1.703 (g/cm³), die mit der β -Bande des DNA-Musters aus ganzen Zellen (Abb. 24, Seite 68) identisch ist. *Micrococcus luteus*-DNA (1.731 g/cm³) dient als Referenz.

DNase-Inkubation und CsCl-Dichtegradientenzentrifugation wiedergegeben. Als Referenz dient *Micrococcus luteus*-DNA mit einer Dichte von $1.731 \text{ (g/cm}^3\text{)}$. Für die Mitochondrien-DNA errechnet sich ein Wert von $1.703 \text{ (g/cm}^3\text{)}$. Diese Dichte stimmt mit der β -Bande der Gesamtzell-DNA überein. In weiteren Versuchen konnte dieser Wert bestätigt werden. Abweichungen von der angegebenen Dichte waren nicht größer als $\pm 1/1000 \text{ (g/cm}^3\text{)}$.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die β -Bande des DNA-Musters von POLYTOMA MIRUM mit der Mitochondrien-DNA identisch ist.

Die Identifizierung der γ -Bande kann mit biochemischen Methoden nicht geklärt werden. Eine klare Zuordnung dieser DNA muß der Elektronenmikroskopie verbunden mit der Autoradiographie vorbehalten bleiben.

Für unsere Problemstellung ist bereits die Existenz dieser γ -Bande von großer Bedeutung. Die Möglichkeit, daß es sich um die Plastiden-DNA handeln könnte, ist nicht auszuschließen. Ein Fehlen von Plastiden-DNA erscheint aufgrund des Vorhandenseins der γ -Bande unwahrscheinlich. Damit kann das Vorkommen von plastidären Ribosomen in POLYTOMA MIRUM auch aufgrund der DNA-Untersuchungen erwogen werden. Die Ergebnisse der Gradientenzentrifugation und Elektrophorese, die eine Anwesenheit plastidärer Ribosomen möglich erscheinen lassen, stellen eine Ergänzung zu den Befunden der DNA-Extraktion dar.

3. Zusammenfassung

Das DNA-Muster ganzer POLYTOMA-Zellen ist durch das Auftreten von drei Banden charakterisiert. Die Kern-DNA (α -Bande) besitzt eine Dichte von $1.716 \text{ (g/cm}^3\text{)}$ und somit einen GC-Gehalt von 57.2 Mol-%. Die β -Bande mit einer Dichte von $1.703 \text{ (g/cm}^3\text{)}$ konnte aufgrund der Mitochondrienisolation als Mitochondrien-DNA identifiziert werden. Ihr GC-Gehalt beträgt 43.8 Mol-%. Die Identifizierung der γ -Bande mit einer Dichte von $1.669 \text{ (g/cm}^3\text{)}$ war nicht möglich. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Gradientenzentrifugation und der Elektrophorese, die das Vorkommen plastidärer Ribosomen möglich erscheinen lassen, ist die Interpretation der γ -Bande als Plastiden-DNA nicht auszuschließen.

E. Elektronenmikroskopische Untersuchung der plastidären Strukturkomponenten von POLYTOMA MIRUM, sowie Überprüfung der Funktion des genetischen Apparates*

Im Mittelpunkt der elektronenmikroskopischen Untersuchungen stand die Frage nach der Existenz plastidärer Strukturkomponenten in POLYTOMA MIRUM. In diesem Zusammenhang sollten die Ergebnisse der Biochemie überprüft und ihre Aussagen eindeutig formuliert werden.

Wie die Feinstrukturuntersuchungen zeigen (Abb. 27), be-

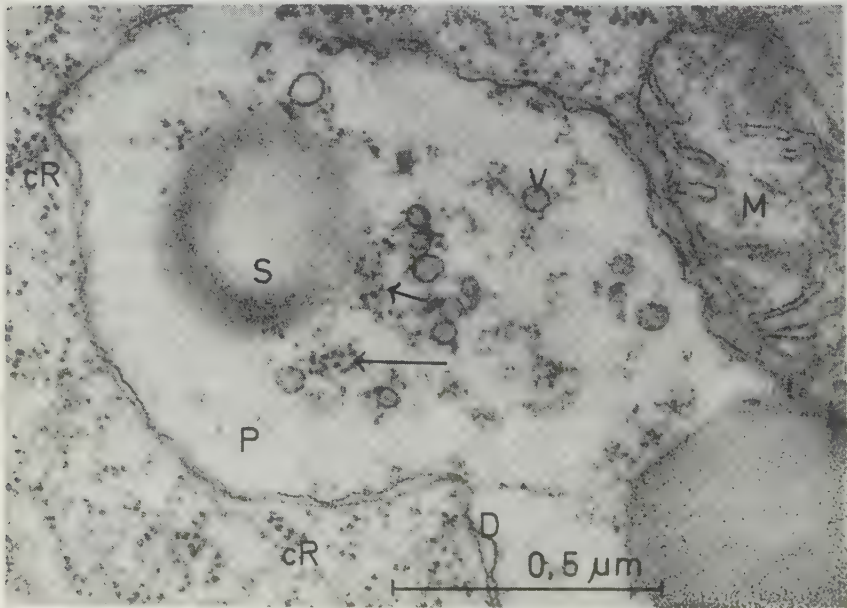


Abb. 27

Plastid von POLYTOMA MIRUM mit Strukturkomponenten

Innerhalb des Plastiden sind neben Stärke und Vesikel auch ribosomale Partikel zu erkennen, die hinsichtlich Form und Aussehen mit den cytoplasmatischen Ribosomen übereinstimmen (→). cR = cytoplasmatische Ribosomen, D = plastidäre Doppelmembran, M = Mitochondrien, P = Plastid, S = Stärke, V = Vesikel

* Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen führten wir an Osmiumtetroxid-fixierten Zellen durch (1 % OsO₄ in 0.025 M Collidin-HCl-Puffer, pH 7.2). Zur Nachkontrastierung verwendeten wir Uranylacetat und Bleicitrat nach REYNOLDS (BEHN 1973). Die Beobachtung der Dünnschnitte erfolgte in dem JEOL-7A Elektronenmikroskop.

sitzt die Organelle die charakteristische Doppelmembran. Im Innern des Plastiden sind neben Stärke relativ wenige Strukturkomponenten zu finden. Überraschenderweise konnten wir Partikel nachweisen, die hinsichtlich Größe, Form und Aussehen als Ribosomen zu interpretieren sind. Die Übereinstimmung bezüglich dieser Kriterien mit den cytoplasmatischen Ribosomen sprechen für die Existenz ribosomaler Partikel im Plastiden von *POLYTOMA MIRUM* (Abb. 27). Während die Ergebnisse der Biochemie das Vorhandensein plastidärer Ribosomen wahrscheinlich erscheinen lassen, kann durch die Methoden der Elektronenmikroskopie ihre Existenz eindeutig demonstriert werden. Wesentlich ist aber die Tatsache, daß diese plastidären Partikel nur in sehr geringen Mengen nachweisbar sind. Es ist somit verständlich, daß sie mit biochemischen Methoden nicht sicher zu identifizieren sind.

Das Vorhandensein von plastidären Ribosomen fordert die Existenz einer Plastiden-DNA. Die Befunde der Biochemie stellen

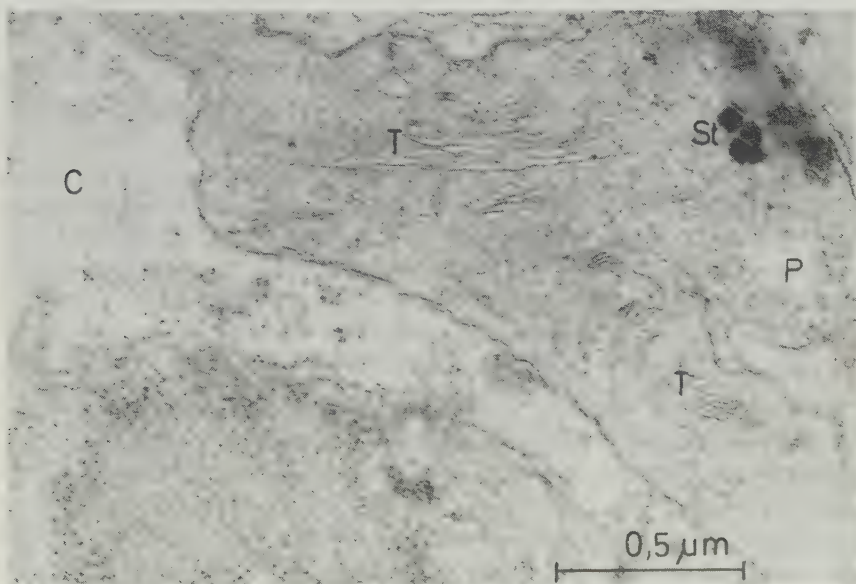


Abb. 28

Plastid von *POLYTOMA MIRUM* mit tubulären Strukturelementen

Das Auftreten größerer Mengen tubulärer Strukturkomponenten führt häufig zu einer Regelmäßigkeit hinsichtlich ihrer Anordnung.
C = Cytoplasma, P = Plastid, St = Stigma, T = tubuläre Strukturkomponenten

die χ -Bande des DNA-Musters als mögliche Lösung des Problems zur Diskussion. Von seiten der Elektronenmikroskopie können wir über den qualitativen Nachweis einer Plastiden-DNA noch keine Aussagen machen. Die Beantwortung dieser Frage erfordert eine Modifizierung der Methode (KOWALLIK und HERRMANN 1972). Versuche dieser Art sind in Vorbereitung.

Als weitere plastidäre Strukturkomponenten konnten wir zahlreiche Vesikel (Abb. 27) und tubuläre Elemente (Abb. 28) identifizieren, die LANG (1963) bei seinen Untersuchungen an POLYTOMA UVELLA ebenfalls nachweisen konnte. Die tubulären Strukturen treten manchmal gehäuft auf und besitzen dann eine gewisse Regelmäßigkeit hinsichtlich ihrer Anordnung. Bezüglich der quantitativen Verteilung überwiegen die bläschenartigen Vesikel.

Die biochemischen und elektronenmikroskopischen Ergebnisse sprechen für die Existenz eines genetischen Apparates, bestehend aus der Organellen-DNA und den plastidären Ribosomen. In weiteren Untersuchungen sollte nun die Frage geklärt werden, welche Genprodukte von diesem Protein-synthetisierenden System gebildet werden. Eine Lösung dieses Problems ist dadurch gegeben, daß man die Syntheseleistung dieses Systems spezifisch hemmt und dann nach Veränderungen in der Feinstruktur des Plastiden sucht. Als gebräuchliche Inhibitoren finden gewisse Antibiotika Verwendung. Für unsere Untersuchungen benutzten wir Streptomycin, das die Translation an den mitochondrialen und plastidären Ribosomen hemmt (DAVIES und MODOLELL 1969, LUZZATTO et al. 1969), und Rifampicin, das in vivo die plastidäre DNA-abhängige RNA-Polymerase blockiert (SURZYCKI 1969).

Da keinerlei Befunde über die Verträglichkeit von Streptomycin bei POLYTOMA MIRUM vorlagen, untersuchten wir zunächst den Einfluß des Antibiotikum auf das Wachstum. Die Zellen wurden im Minimalmedium kultiviert und während der gesamten Wachstumsphase mit Streptomycin inkubiert. Wie Abb. 29 zeigt, wird das Wachstum bereits bei einer Dosierung von 1 $\mu\text{g/ml}$ beeinflusst. Eine Verdoppelung dieser Konzentration führt zur Reduzierung der erreichbaren Zelldichte um etwa die Hälfte gegenüber der Kontrolle. Bei 5 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin ist das Wachstum ganz signifikant gehemmt.

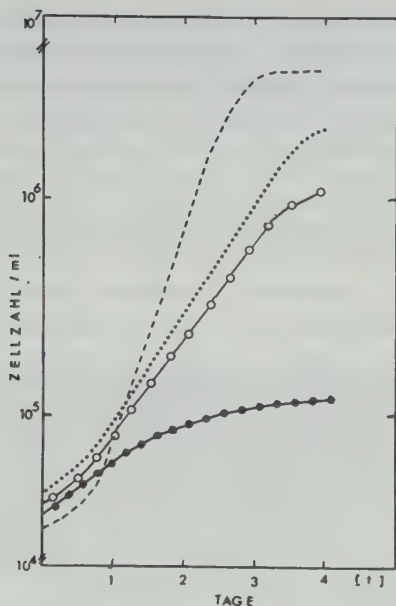


Abb. 29

Beeinflussung des Wachstums durch Streptomycin

Bei einer Dosierung von 1 µg/ml Streptomycin (. . .) wird das Wachstum bereits beeinflusst. Bei 2 µg/ml Antibiotikum (-o-o-) wird nur die Hälfte der Zelldichte gegenüber der Kontrolle (- - -) erreicht. 5 µg/ml Streptomycin hemmen das Wachstum signifikant (-●-●-).

Analoge Untersuchungen wurden bereits bei früheren Versuchen mit Rifampicin durchgeführt (Abb. 20, Seite 53).

Um den Einfluß dieser Antibiotika auf die Feinstruktur des Plastiden prüfen zu können, werden die Zellen im Minimalmedium kultiviert und mit Streptomycin (1 µg, 2 µg, 5 µg/ml) bzw. Rifampicin (80 µg, 100 µg, 120 µg, 140 µg/ml) während der gesamten Wachstumsphase inkubiert. Nach zwei und vier Tagen werden jeweils Proben entnommen und für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen präpariert. Dabei zeigt sich, daß nach zwei Tagen durch keines der verwendeten Antibiotika signifikante Veränderungen in der Feinstruktur des Plastiden erreicht werden.

Dieses Ergebnis ist aufgrund quantitativer Überlegungen verständlich. Unbehandelte Zellen enthalten wenige Strukturkomponenten, die außerdem keineswegs eine charakteristische bzw. funktionsbedingte Anordnung haben. Veränderungen sowie vermindertes Auftreten solcher Strukturen lassen sich nach dieser Einwirkungsdauer der Antibiotika ohne aufwendige Statistik nicht nachweisen.

Klare Aussagen können wir nach einer Inkubationsdauer von vier Tagen machen. Streptomycin behandelte Zellen zeigen eine drastische Reduzierung der plastidären Strukturen. Tubuläre Membranen sind kaum mehr nachweisbar, und das Auftreten von

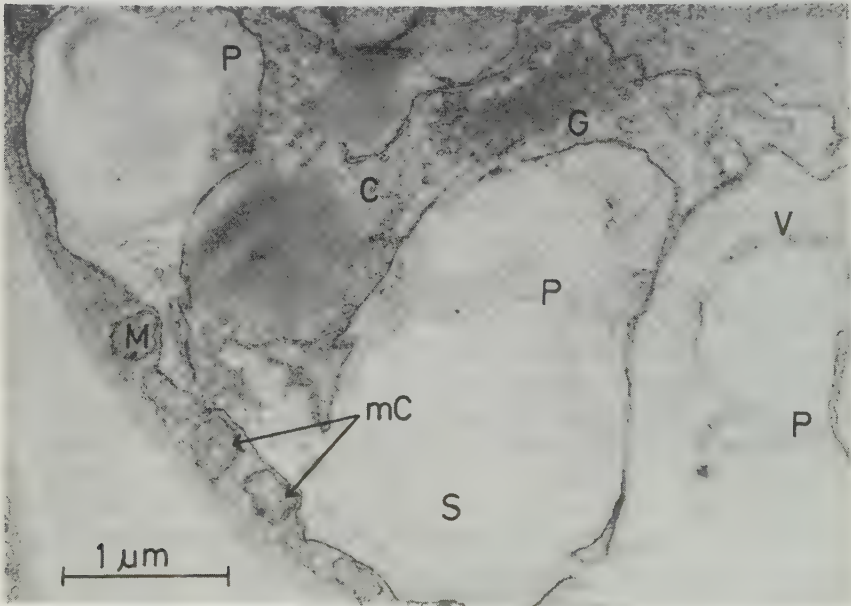


Abb. 30

Einfluß von Streptomycin auf die Feinstruktur des Plastiden

Die plastidären Strukturen sind nach Inkubation von 1 µg/ml Streptomycin (vier Tage) drastisch reduziert. Während tubuläre Elemente kaum noch nachweisbar sind, kann man gelegentlich Vesikel finden. Die Anordnung der mitochondrialen Cristae ist gestört.

C = Cytoplasma, G = Golgi-Apparat, mC = mitochondriale Cristae, M = Mitochondrien, P = Plastid, S = Stärke, V = Vesikel

Vesikeln ist deutlich vermindert. In Abb. 30 sieht man neben großen, vollkommen strukturlosen Bereichen des Plastiden gelegentlich vesikuläre Partikel. Störungen der inneren Membran sowie Reduzierung der Stärke konnte nicht beobachtet werden. Weiterhin fallen die relativ kleinen Mitochondrien auf, die zum Teil geschwollen sind und Störungen hinsichtlich der Anordnung der Cristae zeigen. Diese Anomalien der mitochondrialen Feinstruktur waren insofern zu erwarten, als Streptomycin neben den plastidären auch die mitochondrialen Ribosomen angreift.

Die Beeinflussung der plastidären Feinstruktur ist bei 1 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin genauso intensiv wie bei 5 $\mu\text{g/ml}$. Offensichtlich ist die verlängerte Inkubationsdauer wichtiger als eine Erhöhung der Dosierung.

Der Einfluß von Rifampicin führt zu denselben Veränderungen im Plastiden, wie sie für das Streptomycin beschrieben sind.

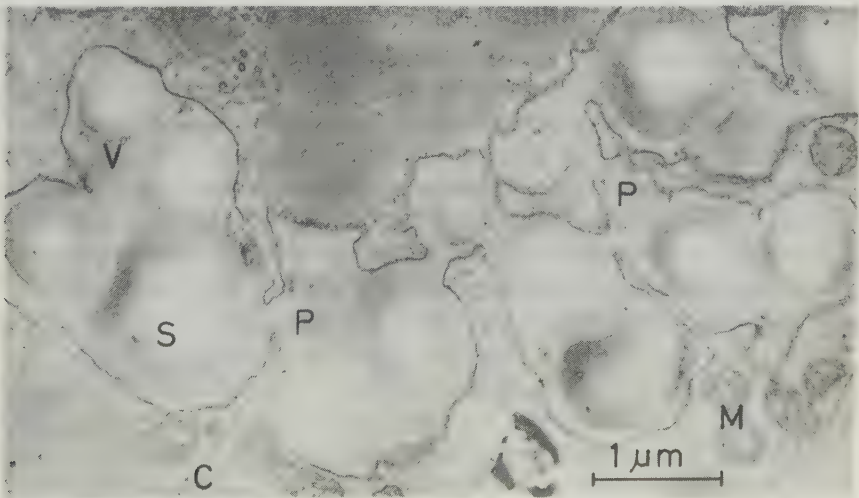


Abb. 31

Feinstruktur des Plastiden unter Rifampicin-Einfluß

Die Einwirkung von 140 $\mu\text{g/ml}$ Rifampicin (vier Tage) führt zur deutlichen Reduzierung der plastidären Strukturelemente. Vesikel sind gelegentlich noch nachweisbar. Die Mitochondrien werden durch das Antibiotikum nicht beeinflusst.

C = Cytoplasma, M = Mitochondrien, P = Plastid, S = Stärke,
V = Vesikel

Klare Unterschiede in der plastidären Feinstruktur gegenüber der Kontrolle werden bei einer Dosierung von 140 µg/ml Rifampicin erzielt. In Abb. 31 wird das strukturlose Aussehen des Plastiden aufgrund der Einwirkung durch das Antibiotikum deutlich.

Diese Befunde zeigen, daß auch bei POLYTOMA MIRUM eine Wirksamkeit von Rifampicin in vivo gegeben ist. Die intakte Struktur der Mitochondrien spricht dafür, daß der Angriffspunkt von Rifampicin spezifisch im Plastiden liegen muß. Dieses Ergebnis stimmt mit den Angaben von SURZYCKI (1969) bei CHLAMYDOMONAS REINHARDII überein, der einen spezifischen Hemmeffekt auf den Plastiden nachweisen konnte.

Aussagen über eventuelle reduzierte Ribosomenzahlen können nicht gemacht werden, da das Vorkommen dieser plastidären Partikel bereits bei der Kontrolle ausgesprochen beschränkt ist und zahlenmäßige Veränderungen nur durch ausgedehnte Statistik nachweisbar sind.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Ergebnisse der Antibiotikaversuche für das Vorhandensein eines genetischen Apparates im Plastiden von POLYTOMA MIRUM sprechen. Wie die Streptomycin-Versuche zeigen, müssen die Vesikel und tubulären Membranen zumindestens teilweise an den plastidären Ribosomen synthetisiert werden. Aufgrund der Rifampicin-Versuche muß die Information für diese Strukturelemente wenigstens zum Teil auf der Plastiden-DNA liegen. Weiterhin muß die r-RNA der plastidären Ribosomen durch die Organellen-DNA codiert werden.

IV. Diskussion

Die allgemein anerkannte Vorstellung, daß die farblosen Algen sich von chlorophyllhaltigen Vorfahren ableiten, gründet sich auf die Untersuchungsergebnisse der Biochemie und Physiologie. Eine kontinuierliche Aufzeichnung dieses Evolutionsweges anhand taxonomischer Reihen ist allerdings undurchführbar, weil nicht alle entwickelten Lebensformen noch existent sind. Sicher ist aber, daß der Vorgang der Apochlorose schrittweise erfolgte und sich im wesentlichen in folgende Abschnitte gliederte.

Da der Chlorophyllverlust mit einer Umstellung der Ernährungsweise verbunden ist, mußte zunächst die obligate Photoautotrophie, wie sie noch bei *CHLAMYDOMONAS MOEWUSII* vorliegt (LEWIN 1950), durch die mixotrophe Ernährungsform erweitert werden. Damit blieb die Photosynthese nicht die einzige Nährstoffquelle, da darüber hinaus die Verwertung von organischen Substraten und das Wachstum im Dunkeln möglich war.

Mit der Mixotrophie war die physiologische Voraussetzung für die Apochlorose gegeben, so daß durch verschiedene Mutationen aus der grünen *CHLAMYDOMONAS*-Zelle - möglicherweise über zahlreiche Übergangsformen hinweg - der farblose *POLYTOMA*-Flagellat entstehen konnte. Auf ähnliche Weise muß im Verlauf der Evolution aus der grünen Gattung *EUGLENA* die farblose Parallelfarm *ASTASIA* entstanden sein.

Während die Ernährungsform experimentell nicht beeinflusbar ist, kann man den Chlorophyllverlust unter Anwendung entsprechender Methoden nachvollziehen. Das Auftreten farbloser Flagellaten bei *EUGLENA GRACILIS* läßt sich durch Streptomycin-Behandlung (PROVASOLI et al. 1948) oder UV-Behandlung (PRINGSHEIM 1958) induzieren. Auch bei *CHLAMYDOMONAS* kann man Chlorophylldefektmutanten erhalten (LEVINE 1968). Sicherlich sind diese weißen Mutanten mit dem farblosen Wildtyp *POLYTOMA* und *ASTASIA* nicht identisch.

Die systematische Untersuchung der einzelnen Arten innerhalb der Gattung *POLYTOMA* gestaltet sich schwierig, weil morphologische Unterscheidungsmerkmale (Chloroplastenform, Pyrenoidgestalt), wie sie bei den Grünalgen Anwendung finden, nicht vorhanden sind. Es erscheint daher sinnvoll, die Systematik nicht

allein auf lichtmikroskopisch identifizierte Merkmale aufzubauen, sondern auch die Ernährungsphysiologie in die taxonomischen Betrachtungen einzubeziehen.

Ein physiologischer Vergleich zwischen farblosen und chlorophyllhaltigen Algen läßt in erster Linie Gemeinsamkeiten in der Verwertung von N-Quellen erwarten. Die Prüfung verschiedener anorganischer N-Verbindungen zeigt, daß für *POLYTOMA MIRUM* außer Ammonium sogar Nitrat als Substrat dienen kann. Die Verwertung dieser N-Quelle erfordert ein Enzymsystem, das Nitrat zu Ammonium reduzieren kann (CZYGAN 1971). Die notwendigen Reduktionsäquivalente können wegen der fehlenden Assimilationspigmente nicht photochemisch über die Photosynthese zur Verfügung gestellt werden, sondern müssen aus anderen Stoffwechselprozessen stammen. Die Fähigkeit der Nitratreduktion ist deshalb bei den farblosen Flagellaten seltener anzutreffen, wohingegen bei Grünalgen Nitrat in der Regel das N-Substrat darstellt. Innerhalb der Gattung *POLYTOMA* ist die Nitratverwertung nur noch bei *POLYTOMA OCCELATUM* (PRINGSHEIM 1963) gegeben. Beide Arten stehen deshalb hinsichtlich der N-Quellen der verwandten Gattung *CHLAMYDOMONAS* sehr nahe.

Bei der heterotrophen Kultivierung der Grünalgen wird Acetat in überwiegendem Maße als C-Quelle bevorzugt. PRINGSHEIM (1921) konnte bei der Gattung *POLYTOMA* ebenfalls eine ubiquitäre Verwertung von Acetat als C-Substrat feststellen. Diese Vorstellung trifft jedoch für *POLYTOMA MIRUM* nicht zu, da nach unseren Untersuchungen Glucose durch Acetat nicht zu ersetzen ist. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Angaben von PRINGSHEIM (1954), der auch mit Acetat eine Vermehrung nachweisen konnte. Eine Diskussion dieser gegensätzlichen Befunde ist aufgrund der unzureichenden methodischen Angaben des Autors nicht möglich.

Die physiologische Sonderstellung von *POLYTOMA MIRUM* liegt nicht in der Glucoseverwertung begründet, sondern wird auch im pH-Bereich des Wachstums deutlich. *POLYTOMA MIRUM* wächst im schwach sauren Milieu, während alle anderen Vertreter dieser Gattung sowie alle *CHLAMYDOMONAS*-Arten mehr im schwach basischen gedeihen. Eine ähnliche Ausnahme stellt in der Gattung *CHLAMYDOMONAS* die Art *PSEUDOCOCCUM* dar, die ebenfalls im Dun-

kein Glucose verwertet (LUCKSCH 1933).

Eine abschließende Betrachtung dieser ernährungsphysiologischen Befunde zeigt, daß über die morphologischen Merkmale hinaus verwandtschaftliche Beziehungen zwischen den farblosen und den chlorophyllhaltigen Flagellaten zu erkennen sind. Unter Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte kann man die farblose POLYTOMA MIRUM als Analogon zur Grünalge CHLAMYDOMONAS PSEUDOCOCCUM bezeichnen, da beide die Fähigkeit der Nitratreduktion und der Glucoseverwertung besitzen.

Bei der Untersuchung der Frage nach der Biogenese und der genetischen Autonomie des Plastiden sind von seiten der farblosen Algen wichtige Beiträge zu erwarten. Der Vorteil dieser apochlorotischen Flagellaten besteht vor allem darin, daß ihr Plastid im Gegensatz zum Chloroplasten der Grünalgen kein derart komplexes Organell darstellt. Das Fehlen von zahlreichen Photosynthese-Enzymen sowie die Reduzierung der Feinstrukturkomponenten führen zu übersichtlicheren Verhältnissen. Voraussetzung für die Wahl dieser Organismen als Untersuchungsobjekte ist allerdings das Vorhandensein eines genetischen Apparates, bestehend aus plastidären Ribosomen und der Organellen-DNA.

Die Frage nach dem Vorhandensein von plastidären Ribosomen in POLYTOMA MIRUM versuchten wir mit biochemischen und elektronenmikroskopischen Methoden zu klären. Während durch einfache Gradientenzentrifugation im Ribosomenmuster kein 72 S-Peak nachweisbar ist, zeigt die elektrophoretische Auftrennung der Nucleinsäuren neben den cytoplasmatischen r-RNA-Species auch 22 S- und 16 S-r-RNA-Typen. Die eindeutige Identifizierung dieser r-RNA-Banden als plastidäre Komponenten kann deshalb nicht erfolgen, weil ihre Synthese durch Rifampicin nicht nennenswert zu beeinflussen ist. Das grundsätzliche Auftreten dieser Banden sowie der Nachweis von 72 S-Ribosomen durch Anreicherung dieses S-Bereiches sind noch kein Beweis für die Existenz plastidärer Ribosomen, weil mitochondriale Ribosomen nicht auszuschließen sind. Der Beweis erfolgte durch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen, die das Vorhandensein ribosomaler Partikel in Plastiden bestätigen.

POLYTOMA MIRUM besitzt also in sehr geringen Mengen plastidäre Ribosomen, die durch die gewählten biochemischen Me-

thoden nicht sicher nachzuweisen sind.

Ähnliche Ergebnisse berichten DYER et al. (1971), die bei elektrophoretischer Auftrennung der Nucleinsäuren aus Wurzel- und Sproßspitzen von VICIA FABA keine plastidären RNA-Species nachweisen konnten. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen aber zeigen, daß in den Wurzeleukoplasten sehr geringe Mengen, in den Proplastiden der Sproßspitzen dagegen größere Anteile ribosomaler Partikel zu finden sind. Auch in den mutierten bleichen Plastiden der ergrünungsfähigen Sorte "Mrs. Pollock" von PELARGONIUM ZONALE (BÖRNER et al. 1972) sowie bei der ebenfalls ergrünungsfähigen γ_1 -Mutante von CHLAMYDOMONAS REINHARDII (OHAD et al. 1967) sind noch Ribosomen vorhanden. Offenbar ist das Vorkommen ribosomaler Partikel für die Differenzierung und Umwandlung in die einzelnen Plastidenformen notwendig.

Keine plastidären Ribosomen können in den farblosen Plastiden aus weißen Blättern der Plastommutante "Mrs. Parker" von PELARGONIUM ZONALE nachgewiesen werden (BÖRNER et al. 1972). Auch in den chlorophyllfreien Plastiden der Mutanten von ZEA MAYS (SHUMWAY und WEIER 1967), VICIA FABA (DYER et al. 1971) und GERSTE (SPREY 1972) sind keine Ribosomen zu finden. Diese Ergebnisse sind durch elektronenmikroskopische Untersuchungen abgesichert und sprechen dafür, daß bei diesen Mutanten im Gegensatz zu POLYTOMA MIRUM ein anderer genetischer Block bei der Biosynthese plastidärer Ribosomen vorliegen muß. Die induzierten Chlorophylldefektmutanten unterscheiden sich also von den farblosen Algen, die sich im Verlauf der Evolution spontan entwickelt haben.

Obwohl die Existenz plastidärer Ribosomen das Vorhandensein einer Organellen-DNA konsequenterweise fordert, kann der eindeutige Nachweis einer Plastiden-DNA in POLYTOMA MIRUM mit biochemischen Methoden nicht geführt werden. Die Tatsache liegt darin begründet, daß vorläufig eine Organellenisolierung aufgrund der großen Labilität des Plastiden gegenüber jedem mechanischen Zellaufschluß nicht möglich ist. Das Auftreten von drei verschiedenen Banden im DNA-Spektrum schließt aber die Möglichkeit des Vorhandenseins einer Plastiden-DNA nicht aus. Da die α -Bande wegen der Quantität der Kern-DNA zugeordnet wird und

die β -Bande aufgrund der Mitochondrienisolation als Mitochondrien-DNA identifiziert werden konnte, ist die Interpretation der γ -Bande als Plastiden-DNA zu diskutieren. Versuche zur Überprüfung dieser Vorstellungen mit den Methoden der Elektronenmikroskopie sind in Vorbereitung. Die Existenz der γ -Bande sowie die Identifizierung plastidärer Ribosomen und die Beeinflussung der Feinstruktur des Plastiden durch Rifampicin lassen mit hoher Wahrscheinlichkeit einen elektronenmikroskopischen Beweis für das Vorhandensein einer Plastiden-DNA erwarten.

Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen pigmentfreier Mutanten von ZEA MAYS (SHUMWAY und WEIER 1967), weißer TRADE-SCANTIA-Plastiden (SPREY 1966) und chlorophyllfreier Plastiden von VICIA FABA (DYER et al. 1971) konnte das Vorhandensein einer Plastiden-DNA in diesen Plastidmutanten nachgewiesen werden. Außerdem wurde die Plastiden-DNA in den farblosen Plastiden der Mutanten von GERSTE (SPREY 1972) und NICOTIANA TABACUM (WILDMANN 1971) gefunden. Da Leukoplasten sich im Licht der Chloroplasten umwandeln, war die Existenz einer DNA in diesem Plastidentyp zu erwarten (SWIFT 1965, NEWCOMB 1967). Darüber hinaus konnte das Vorkommen von DNA in Proteinoplasten (SALEMA und BADENHUIZEN 1969) sowie Chromoplasten (HERRMANN 1972, KOWALLIK und HERRMANN 1972) wahrscheinlich gemacht werden.

Diese Befunde zeigen deutlich, daß mit der Anwesenheit von DNA in allen Plastidentypen gerechnet werden muß. Vor allem lassen die Ergebnisse an farblosen Plastiden das Fehlen einer Plastiden-DNA in POLYTOMA MIRUM unwahrscheinlich erscheinen.

Für die einzelnen Banden des DNA-Musters von POLYTOMA MIRUM finden wir folgende Dichten: α (Kern) = $1.716 \text{ (g/cm}^3\text{)}$, β (Mitochondrien) = $1.703 \text{ (g/cm}^3\text{)}$ und γ = $1.699 \text{ (g/cm}^3\text{)}$. Im Gegensatz dazu geben KIERAS und CHIANG (1971) bei POLYTOMA OBTUSUM und POLYTOMA UVELLA nur zwei Banden an, die Dichten von 1.710 (Kern) und 1.683 bzw. $1.681 \text{ (g/cm}^3\text{)}$ besitzen. Die Gegenüberstellung dieser Daten zeigt, daß bereits innerhalb einer Gattung große Unterschiede in den Dichten der DNA-Arten und damit im GC-Gehalt vorkommen können. Die Basenzusammensetzung einer DNA ist deshalb als Kriterium für die verwandtschaftlichen Beziehungen der Organismen ungeeignet. Dies wird besonders dann deutlich, wenn man die DNA-Dichtewerte von

CHLAMYDOMONAS REINHARDII mit α (Kern) = $1.723 \text{ (g/cm}^3\text{)}$, β = $1.711 \text{ (g/cm}^3\text{)}$ und γ (Chloroplast) = $1.695 \text{ (g/cm}^3\text{)}$ (KIERAS und CHIANG 1971) vergleicht. Die Erklärung für dieses Verhalten der DNA ist dadurch gegeben, daß die Dichte durch das Vorkommen von methylierten sowie seltenen Basen entscheidend zu beeinflussen ist.

Anstelle der typischen inneren Lamellarstrukturen des Chloroplasten sind im Plastiden von POLYTOMA MIRUM nur noch Vesikel, tubuläre Elemente sowie die Doppelmembran der Organelle vorhanden, während das Pyrenoid vollkommen fehlt. Ähnliche Störungen der plastidären Feinstruktur zeigen die farblose y_1 - (OHAD et al. 1967) sowie die hellgrüne ac_{20} -Mutante (GOODENOUGH und LEVINE 1970) von CHLAMYDOMONAS REINHARDII. Allerdings sind diese Strukturdefekte durch die Wahl der entsprechenden Kulturbedingungen reparabel. Irreversible Strukturstörungen besitzen die ribosomenfreien Plastidmutanten von GERSTE (SPREY 1972). PELARGONIUM ZONALE (BÖRNER et al. 1972) und VICIA FABA (DYER et al. 1971).

Die Beeinflussbarkeit der plastidalen Proteinsynthese durch die Antibiotika Streptomycin und Rifampicin spricht für die genetische Aktivität des Plastiden von POLYTOMA MIRUM. Das seltene Auftreten der tubulären Elemente sowie die stark reduzierte Vesikelbildung unter Einwirkung dieser Inhibitoren gibt Aufschluß über Synthese- bzw. Codierungsort dieser Komponenten. Danach darf man aufgrund der Versuchsergebnisse mit Streptomycin annehmen, daß Teile dieser Strukturen an den plastidären Ribosomen synthetisiert werden. Die Versuchsergebnisse mit Rifampicin sprechen dafür, daß die Codierung dieser Strukturen wenigstens zum Teil durch die Plastiden-DNA erfolgen muß. Die Codierung der r-RNA plastidärer Ribosomen durch die Organellen-DNA ist eine allgemein bestätigte Tatsache. Die Synthese der Strukturelemente der plastidären Doppelmembran läßt sich durch diese Inhibitoren nicht nachweisbar beeinflussen, so daß keine elektronenmikroskopisch erfaßbare Störung auftritt. Die Folgerung, daß die Hüllmembranen allein vom Cytoplasma gebildet werden, ist aus folgenden Gründen nicht zulässig. Das Elektronenmikroskop kann zwar Strukturdefekte, nicht aber Funktionsstörungen ausschließen. Außerdem kann die Strukturstörung als solche un-

terhalb der Nachweisgrenze liegen. Diese Möglichkeit muß insofern diskutiert werden, als für NEUROSPORA-Mitochondrien (SEBALD et al. 1971) nachgewiesen wurde, daß der Anteil der Organellen synthetisierten Membranproteine nur 5 - 8 % der Gesamtproteine beträgt.

Der Einfluß der Inhibitoren auf lösliche Proteine und Enzyme des Plastiden von POLYTOMA MIRUM ist noch nicht untersucht und kann nur anhand vergleichbarer Versuche bei CHLAMYDOMONAS REINHARDII diskutiert werden. SIEREVAG und LEVINE (1972) finden bei Hemmung der Translation der Plastiden-DNA eine signifikante Reduzierung der Fettsäuresynthese. Da in POLYTOMA ebenfalls das Vorhandensein von Fettsäure nachgewiesen ist (LINKS et al. 1961), muß auch hier mit einer Hemmung der Fettsäure-Synthetase gerechnet werden. Die plastidenspezifische Nitritreduktase wird ebenfalls durch Inhibitoren der 70 S-Ribosomen gehemmt (RITENOUR et al. 1967). Beide Enzyme sind in POLYTOMA MIRUM zu erwarten und müssen mit hoher Wahrscheinlichkeit an den plastidären Ribosomen synthetisiert werden. Während die partielle Codierung der Cytochrome 553 und 565 durch die Plastiden-DNA bei CHLAMYDOMONAS REINHARDII nachgewiesen ist (LEVINE et al. 1970, 1971), können diese Befunde auf POLYTOMA MIRUM nicht übertragen werden, da keine Untersuchungen über das grundsätzliche Vorhandensein dieser Enzyme vorliegen.

Für die Ausbildung voll ausdifferenzierter Chloroplasten ist das Zusammenwirken von cytoplasmatischer und plastideneigener Proteinsynthese notwendig (HAGEMANN 1971). Diese Arbeitsteilung zwischen Kern-DNA und Plastiden-DNA bei der Kontrolle der Entwicklung und Differenzierung des Plastiden wird dadurch deutlich, daß sowohl Kerngen- als auch Plastommutanten Störungen in der plastidären Feinstruktur zeigen. Die Kerngene kontrollieren die Synthese der meisten Lamellenproteine (EYTAN und OHAD 1970), das "Stacking" der Thylakoidmembran (GOODENOUGH et al. 1971) und die Chlorophyllsynthese. Das Fehlen dieser plastidären Strukturkomponenten sowie der Pigmentverlust sprechen für eine mutative Veränderung der Kern-DNA von POLYTOMA MIRUM.

V. Zusammenfassung

1. Ernährungsphysiologische Untersuchungen zeigen, daß Asparagin und Arginin sehr gute organische N-Quellen für POLYTOMA MIRUM darstellen. Auch die Aminosäuren Glycin und Serin erlauben gutes Wachstum.

Als anorganische N-Substrate können sowohl Ammoniumsalze als auch Nitrate dienen. Die Nitratreduktion ist innerhalb der Gattung POLYTOMA nur noch bei POLYTOMA OCCELATUM gegeben.

Da Glucose als C-Quelle weder durch Acetat noch durch Asparagin zu ersetzen ist, handelt es sich bei POLYTOMA MIRUM um einen echten Zuckerflagellaten.

Das Wachstum im schwach sauren pH-Bereich, die Glucose-Verwertung und die Fähigkeit der Nitratreduktion kennzeichnen die ernährungsphysiologische Sonderstellung von POLYTOMA MIRUM innerhalb ihrer Gattung.

2. Während im Ribosomenmuster von CHLAMYDOMONAS REINHARDII noch Saccharose-Gradientenzentrifugation cytoplasmatische 83 S- und plastidäre 72 S-Ribosomen nachweisbar sind, tritt in der Ribosomenkurve von POLYTOMA MIRUM lediglich der cytoplasmatische Peak und nur geringe UV-Absorption im 70 S-Bereich auf. Die Anreicherung dieses S-Bereiches bestätigt die Anwesenheit von 72 S-Ribosomen, die aber aufgrund der ausgesprochen geringen Menge sowohl plastidären als auch mitochondrialen Ursprungs sein können.

Das Vorkommen anderer Ribosomenklassen im Plastiden von POLYTOMA MIRUM ist im Rahmen der Nachweisgrenze der Methode auszuschließen, da sich weder bei Hemmung der plastidären Proteinsynthese mit Rifampicin noch unter dem Einfluß reduzierter Mg^{2+} -Konzentration das Ribosomenmuster ändert.

3. Auch die elektrophoretischen Untersuchungen der Nucleinsäuren sprechen für ein Vorhandensein von 72 S-Ribosomen, da neben den cytoplasmatischen 25 S- und 18 S-r-RNA-Species auch ribosomale 22 S- und 16 S-Fraktionen nachweisbar sind. Eine Identifizierung dieser Fraktionen als plastidäre r-RNA-

Partikel ist aufgrund des nicht eindeutigen Rifampicin-Effektes unmöglich.

4. Während die biochemischen Befunde das Vorhandensein plastidärer Ribosomen möglich erscheinen lassen, beweisen die elektronenmikroskopischen Untersuchungen die Existenz ribosomaler Partikel im Plastiden von POLYTOMA MIRUM. Die Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen macht deutlich, daß es sich um sehr geringe Mengen handelt, die weder durch Saccharose-Gradientenzentrifugation noch durch elektrophoretische Auftrennung der Nucleinsäuren erfaßbar sind.
5. Das DNA-Muster von POLYTOMA MIRUM ist durch das Auftreten von drei Banden charakterisiert. Die Kern-DNA (α -Bande) besitzt eine Dichte von $1.716 \text{ (g/cm}^3\text{)}$. Die β -Bande mit einer Dichte von $1.703 \text{ (g/cm}^3\text{)}$ ist aufgrund der Ergebnisse der Mitochondrienisolation mit der Mitochondrien-DNA identisch. Da eine Plastidenisolierung unter den gegebenen experimentellen Voraussetzungen nicht durchgeführt werden kann, ist die Identifizierung der γ -Bande ($\rho = 1.669 \text{ g/cm}^3$) als Plastiden-DNA nicht möglich. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Elektronenmikroskopie, die das Vorkommen plastidärer Ribosomen bestätigt, ist die Interpretation der γ -Bande als Plastiden-DNA wahrscheinlich.
6. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen, daß im farblosen Plastiden von POLYTOMA MIRUM noch Reststrukturen, wie tubuläre Membranen und Vesikel, vorhanden sind. Die Synthesehemmung dieser Strukturkomponenten durch Streptomycin bzw. Rifampicin spricht dafür, daß diese Partikel zumindestens teilweise an den plastidären Ribosomen synthetisiert bzw. durch die Plastiden-DNA codiert werden. Darüber hinaus darf man die Codierung der r-RNA der plastidären Ribosomen durch die Organellen-DNA annehmen.
7. Die Ergebnisse der Biochemie und Elektronenmikroskopie sprechen dafür, daß auch der farblose Plastid von POLYTOMA MIRUM als genetischer Erbträger zu betrachten ist.

VI. Literaturverzeichnis

- ARNOLD, C.G.: IV. Extrakaryotische Vererbung.
Fortschritte der Botanik 33, 229 - 241 (1971)
- ARNOLD, C.G., O. SCHIMMER, F. SCHÖTZ und H. BARTHELT: Die
Mitochondrien von *Chlamydomonas reinhardtii*.
Arch. Mikrobiol. 81, 50 - 67 (1972)
- BEAVEN, G.H., E.R. HOLIDAY and E.A. JOHNSON:
Optical properties of nucleic acids and their
components.
In: "The Nucleic Acids", Vol. I., p. 493 - 533,
Ed.: E. CHARGAFF and J.N. DAVIDSON,
Academic Press, New York (1955)
- BEHN, W.: Feinstrukturuntersuchungen zur Genlokalisierung
einiger extrakaryotisch vererbter Merkmale bei
Stämmen von *Chlamydomonas reinhardtii*.
Dissertation, Universität Erlangen-Nürnberg (1973)
- BOARDMAN, N.K., R.I.B. FRANCKI and S.G. WILDMAN: Protein
synthesis by cell-free extracts of tobacco leaves.
III. Comparison of the physical properties and
protein synthesizing activities of 70-S chloroplast
and 80-S cytoplasmic ribosomes.
J. Molec. Biol. 17, 470 - 489 (1966)
- BÖRNER, T., R. KNOTH, F. HERRMANN und R. HAGEMANN: Struktur
und Funktion der genetischen Information in den Pla-
stiden. V. Das Fehlen ribosomaler RNS in den Plasti-
den der Plastommutante "Mrs. Parker" von *Pelargonium*
zonale Ait.
Theoret. Appl. Genetics 42, 3 - 11 (1972)
- BOLD, H.C.: The cultivation of algae.
Bot. Rev. 8, 69 - 138 (1942)
- BOTTOMLEY, W., H.J. SMITH and L. BOGORAD: RNA-Polymerase of
maize: Partial purification and properties of the
chloroplast enzym.
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 68, 2412 - 2416 (1971)
- BOURQUE, D.P., J.E. BOYNTON and N.W. GILLHAM: Studies on the
structure and cellular location of various ribosome
and ribosomal RNA species in the green alga *Chlamy-*
domonas reinhardtii.
J. Cell Sci. 8, 153 - 183 (1971)

- BOYNTON, J.E., N.W. GILLHAM and J.F. CHABOT: Chloroplast ribosome deficient mutants in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the question of the chloroplast ribosome function.
J. Cell Sci. 10, 267 - 305 (1972)
- BRÈCHOT, P.: Sur quelques caractères de la matière amylacée élaborée par le flagellé *Polytoma obtusum*.
Compt. rend. Soc. Biol., Paris 126, 555 - 556 (1937)
- BRITTEN, R.J. and R.B. ROBERTS: High-resolution density gradient sedimentation analysis.
Science 131, 32 - 33 (1960)
- BROWN, R., M. BASTIA and R. HASELKORN: Effect of rifampicin on the transcription in chloroplasts of *Euglena*.
In: I. Lepetit Colloquium on Biology and Medicine "RNA-polymerase and transcription".
Amsterdam: North-Holland, Publ. (1968)
- BUCK, R.: Untersuchungen über den Einfluß von Rifampicin auf *Chlamydomonas reinhardtii*.
Diplom, Universität Erlangen-Nürnberg (1971)
- CATTOLICO, R.A. and R.F. JONES: Isolation of stable ribosomal RNA from whole cells of *Chlamydomonas reinhardtii*.
Biochim. Biophys. Acta 269, 259 - 264 (1972)
- CHIANG, K.S. and N. SUEOKA: Replication of chloroplast DNA in *Chlamydomonas reinhardtii* during vegetative cell cycle: its mode and regulation.
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 57, 1506 - 1513 (1967)
- COHN, F.: Über die Entwicklungsgeschichte mikroskopischer Algen und Pilze.
Nova Acta Acad. Leopold 24, 103 - 256 (1853)
- CZYGAN, F.C.: Der Stickstoff-Kreislauf in der Natur.
Biol. Zeit 1, 101 - 110 (1971)
- DANGEARD, P.A.: Etude sur la structure de la cellule et ces fonctions: le *Polytoma uvella*.
Botaniste 8, 5 - 58 (1901)
- DAVIES, B.D. and J. MODOLELL: The action of inhibitors on the 30S-subunit of the bacterial ribosome.
6 th international congress of chemotherapy, abstracts of paper, Aug. 1969, Tokyo

- DYER, T.A., R.H. MILLER and A.D. GREENWOOD: Leaf nucleic acids.
I. Characteristics and role in the differentiation of
plastids.
J. Exp. Bot. 22, 125 - 136 (1971)
- EDELMANN, M., H.T. EPSTEIN and J.A. SCHIFF: Isolation and
characterization of DNA from the mitochondrial
fraction of *Euglena*.
J. Mol. Biol. 17, 463 - 469 (1966)
- EHRENBERG, C.G.: Die Infusionsthierchen als vollkommene
Organismen.
Leipzig 1838
- ENTZ, G.: Über die mitotische Teilung von *Polytoma uvella*.
Arch. Protistenk. 38, 324 - 354 (1918)
- EVERSOLE, R.A.: Crossover frequency studies with biochemical
mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*.
Ph. D. Dissertation Stanford University (1956)
- EYTAN, G. and I. OHAD: Biogenesis of chloroplast membranes.
VI. Cooperation between cytoplasmic and chloroplast
ribosomes in the synthesis of photosynthetic lamellar
proteins during the greening process in a mutant of
Chlamydomonas reinhardtii y-1.
J. Biol. Chem. 245, 4297 - 4307 (1970)
- FIUME, L. and T. WIELAND: Amanitins chemistry and action.
FEBS Lett. 8, 1 - 5 (1970)
- FLASCHENTRÄGER, B. und E. LEHNARTZ: Physiologische Chemie,
Bd. 1, Die Stoffe.
Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg,
738 - 741 (1951)
- FOTT, B.: Algenkunde. 2. Auflage.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1971)
- FRANCÉ, R.: Die *Polytomen*, eine morphologisch-entwicklungsge-
schichtliche Studie.
Jahrb. wiss. Bot. 26, 295 - 378 (1894)
- FUKUHARA, H., M. FRAURES and C. GENIN: Comparison of RNA's
transcribed in vivo from mitochondrial DNA of
cytoplasmic and chromosomal respiratory deficient
mutants.
Mol. Gen. Genetics 104, 264 - 281 (1969)

- GALLING, G.: Über Polysomenpräparationen aus *Chlorella pyrenoidosa*.
Ber. Dtsch. Bot. Ges. 81, 349 - 358 (1968)
- GALLING, G.: Der Einfluß von Rifampicin, Chloramphenicol und Cycloheximid auf den Uridin-Einbau in chloroplastidäre Ribosomenvorstufen von *Chlorella*.
Planta 98, 50 - 62 (1971)
- GARRISON, W.M., D.C. MORRISON, J.G. HAMILTON, A.A. BENSON and M. CALVIN: Reduction of carbon dioxide in aqueous solutions by ionizing radiation.
Science 114, 416 - 418 (1951)
- GESTELAND, R.F.: Unfolding of *Escherichia coli* ribosomes by removal of magnesium.
J. Mol. Biol. 18, 356 - 371 (1966)
- GOODENOUGH, U.W. and R.P. LEVINE: Chloroplast structure and function in ac_{20} , a mutant strain of *Chlamydomonas reinhardtii*. III. Chloroplast ribosomes and membrane organisation.
J. Cell Biol. 44, 547 - 562 (1970)
- GOODENOUGH, U.W., R.K. TOGASAKI, A. PASZEWSKI and R.P. LEVINE: Inhibition of chloroplast ribosome formation by genemutation in *Chlamydomonas reinhardtii*.
In: Autonomy and biogenesis of mitochondria and chloroplasts, p. 224 - 234
Ed.: BOARDMAN, N.K., A.W. LINNANE and R.M. SMILLIE, North-Holland, Publ., Amsterdam (1971)
- GOODWIN, T.W.: Biochemistry of chloroplasts.
Academic Press, London and New York (1966)
- GOWANS, C.S.: Genetic investigations on *Chlamydomonas eugametos*.
Ph. D. Dissertation Stanford University (1957)
- GRUMMT, F. and H. BIELKA: Stepwise dissociation of rat-liver ribosomes into core particles and split proteins.
Biochim. Biophys. Acta 199, 540 - 542 (1970)
- HAGEMANN, R.: Die Stellung des extranukleären (extrachromosomalen) Erbgutes im genetischen System.
Leopoldina: Mitt. Deutsch. Akad. Naturf. Reihe 3, Jg. 16 (1971)

- HARTMANN, G., K. HONIKEL, F. KNÜSEL and J. NÜESCH: The specific inhibition of the DNA- directed RNA synthesis by rifamycin.
Biochim. Biophys. Acta 145, 843 - 844 (1967)
- HERRMANN, R.G.: Do chromoplast contain DNA? II. The isolation and characterization of DNA from chromoplasts, chloroplasts, mitochondria and nuclei of Narcissus.
Protoplasma 74, 7 - 17 (1972)
- HERZFELD, F.: Rifampicin insensitivity of RNA synthesis in Neurospora mitochondria.
Hoppe- Seylers Z. physiol. Chem. 351, 658 - 660 (1970)
- HOLLANDE, A.: Etude cytologique et biologique de quelques flagellés libres.
Arch. Zool. exp. gén. 83, 1 - 268 (1942)
- HOOBER, J.K. and G. BLOBEL: Characterization of the chloro- plastic and cytoplasmatic ribosomes of Chlamydomonas reinhardi.
J. Mol. Biol. 41, 121 - 138 (1969)
- HOTTA, J. and A. BASSEL: Molecular size and circularity of DNA in cells of mammals and higher plants.
Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 53, 356 - 362 (1965)
- HOVASSE, R.: Contribution à l' étude des flagellés libres: Oicomonas beauchampi sp. nov., Protomonadine et Chrysomonade.
Arch. Zool. exp. gén. 83, 47 - 53 (1943)
- HOVASSE, R.: Le "réseau de Volkonsky" des Polytoma n'est pas un leucoplaste, mais représente une partie du chondriom cellulaire.
Compt. rend. Soc. Biol., Paris 141, 116 - 117 (1947)
- HUTNER, S.H., L. PROVASOLI, A. SCHATZ and C.P. HASKINS:
Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganismus.
Proc. Amer. Philosoph. Soc. 94, 152 - 170 (1950)
- JIROVEC, O.: Der Einfluß des Streptomycins und Patulins auf einige Protozoen.
Experientia 5, 74 - 77 (1949)

- JOYON, L.: Sur la présence d'un leucoplaste chez des *Polytoma*.
Compt. rend. Soc. Biol. 156, 1300 - 1302 (1962)
- KAPLAN, R.W.: Molekularbiologische Probleme der Lebens-
entstehung.
Naturwiss. 55, 97 - 104 (1968)
- KIERAS, F.J. and K.S. CHIANG: Characterization of DNA
components from some colorless algae.
Exptl. Cell Res. 64, 89 - 96 (1971)
- KIRBY, K.S.: Isolation and characterization of ribosomal
ribonucleic acid.
Biochem. J. 96, 266 - 269 (1965)
- KIRK, J.T.O. and R.A.E. TILNEY-BASSET: The plastids.
Freeman-London (1967)
- KOCHERT, G. and W. SANSING: Isolation and characterization of
nucleic acids from *Volvox carteri*.
Biochim. Biophys. Acta 238, 397 - 405 (1971)
- KOWALLIK, K.V. and R.G. HERRMANN: Do chromoplast contain DNA?
I. Electron-microscopic investigation of *Narcissus*
chromoplasts.
Protoplasma 74, 1 - 6 (1972)
- KRAWIEC, S. and J.M. EISENSTADT: Ribonucleic acids from the
mitochondria of bleached *Euglena gracilis* z.
Biochim. Biophys. Acta 217, 120 - 131 (1970)
- KÜNTZEL, H. and K.P. SCHÄFER: Mitochondrial RNA Polymerase
from *Neurospora crassa*.
Nature New Biology, 231, 265 - 269 (1971)
- KUHN, H.: Selbstorganisation molekularer Systeme und die
Evolution des genetischen Apparats.
Angew. Chemie 84, 838 - 682 (1972)
- LANG, N.: Electron-microscopic demonstration of plastids
in *Polytoma*.
J. Protozool. 10, 333 - 339 (1963)
- LANG, N. and P. COOK: Ultrastructure and pigment analysis
of *Polytoma*.
Americ. J. Bot. 49, 672 (1962)

- LEAVER, C.J. and J. INGLE: The molecular integrity of chloroplast ribosomal ribonucleic acid.
Biochem. J. 123, 235 - 243 (1971)
- LEVINE, R.P.: Genetic dissection of photosynthesis.
Science 162, 768 - 771 (1968)
- LEVINE, R.P., J.J. ARMSTRONG and S.J. SURZYCKI: Genetic transcription and translation specifying chloroplast components in *Chlamydomonas reinhardtii*.
J. Cell Biol. 47, 120 - 121 (1970)
- LEVINE, R.P., J.J. ARMSTRONG, S.J. SURZYCKI and B. MOLL: Genetic transcription and translation specifying chloroplast components in *Chlamydomonas reinhardtii*.
Biochem. 10, 692 - 701 (1971)
- LEVINE, R.P. and W.T. EBERSOLD: The relation of calcium and magnesium to crossing-over in *Chlamydomonas reinhardtii*.
Z. Vererbungslehre 89, 631 - 635 (1958)
- LEWIN, J.C.: Obligate autotrophy in *Chlamydomonas moewusii* GERLOFF.
Science 112, 652 - 653 (1950)
- LINKS, J.: Proefschrift: I. En hypothese over het mechanisme van de (photo-) chemotaxis, II. De carotinoiden, steroiden en vetzuren van *Polytoma uvella*.
Leiden (1955)
- LINKS, J., A. VERLOOP and E. HAVINGA: The carotenoids of *Polytoma uvella*.
Arch. Mikrobiol. 36, 306 - 324 (1960)
- LINKS, J., A. VERLOOP and E. HAVINGA: Some growth experiments with *Polytoma uvella* on synthetic media.
Antonie v. Leeuwenhoek 27, 76 - 80 (1961)
- LINKS, J., A. VERLOOP and E. HAVINGA: The steroids and higher fatty acid of the phytoflagellate *Polytoma uvella*.
Antonie v. Leeuwenhoek 27, 161 - 170 (1961)
- LLOYD, D., D.A. EVANS and S.E. VENABLES: Propionate assimilation in the flagellate *Polytomella caeca*.
Biochem. J. 109, 897 - 907 (1968)
- LOENING, U.E.: The fractionation of high-molecular-weight ribonucleic acid by polyacrylamide gel electrophoresis.
Biochem. J. 102, 251 - 257 (1967)

- LOENING, U.E.: Molecular weights of ribosomal RNA in relation to evolution.
J. Mol. Biol. 38, 355 - 365 (1968)
- LOENING, U.E. and V. INGLE: Diversity of RNA components green plants tissues.
Nature, (Lond.) 215, 363 - 367 (1967)
- LUCKSCH, I.: Ernährungsphysiologische Untersuchungen an Chlamydomonadeen.
Beih. Bot. Zbl. I. A., 50, 64 - 94 (1933)
- LUZZATTO, L., D. APIRION and D. SCHLESSINGER: Polyribosome depletion and blockade of the ribosome cycle by streptomycin in *E. coli*.
J. Mol. Biol. 42, 315 - 355 (1969)
- LWOFF, A.: La nutrition de *Polytoma uvella* EHRBG. et la pouvoir de synthèse des protistes hétérotrophes. Les protistes metatrophes.
Compt. rend. Acad. Sci. Paris 188, 114 - 116 (1929)
- LWOFF, A.: Introduction to biochemistry of Protozoa.
In: Biochemistry and physiology of Protozoa.
Ed. A. LWOFF, Vol. I, New York (1951)
- LWOFF, A. und L. PROVASOLI: La nutrition de *Polytoma caudatum* var. *astigmata*.
Compt. rend. Soc. Biol., Paris 119, 90 - 92 (1935)
- LYTTLETON, J.W.: Isolation of ribosomes from spinach chloroplasts.
Exp. Cell Res. 26, 312 - 317 (1962)
- MARMUR, J.: A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganismus.
J. Mol. Biol. 3, 208 - 218 (1961)
- MILLER, S.L.: A production of amino acids under possible primitive earth conditions.
Science 117, 528 - 529 (1953)
- MOEWUS, F.: Über die Vererbung des Geschlechts bei *Polytoma Pascheri* und *Polytoma uvella*.
Zeitschr. Indukt. Abstamm. - u. Vererbungslehre 69, 374 - 417 (1935)

- MORIMOTO, H. and H.O. HALVORSON: Characterization of mitochondrial ribosomes from yeast.
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 68, 324 - 328 (1971)
- NASS, M.: Mitochondrial DNA: Advances, problems and goals.
Science 165, 25 - 35 (1969)
- NEWCOMB, E.H.: Fine structure of protein-storing plastids in bean root tips.
J. Cell Biol. 33, 143 - 163 (1967)
- OHAD, I., P. SIEKEVITZ and G.E. PALADE: Biogenesis of chloroplast membranes. I. Plastid dedifferentiation in a dark-grown algal mutant (*Chlamydomonas reinhardtii*).
J. Cell Biol. 35, 521 - 552 (1967)
- OPARIN, A.: Die Entstehung des Lebens auf der Erde.
VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin (1957)
- PANEQUE, A., F.F. DEL CAMPO, J.M. RAMIREZ and M. LOSADA: Flavin nucleotide nitrate reductase from spinach.
Biochim. Biophys. Acta 109, 79 - 85 (1965)
- PANEQUE, A. and M. LOSADA: Comparative reduction of nitrate by spinach nitrate reductase with NADH_2 and NADPH_2 .
Biochim. Biophys. Acta 128, 202 - 204 (1966)
- PARTHIER, B.: Existenz und Realisierung extrachromosomaler Information in Plastiden und Mitochondrien.
Biol. Rdsch. 8, 289 - 306 (1970)
- PASCHER, A.: Volvocales in: Süßwasserflora Deutschlands, Österreichs und der Schweiz.
Heft 4, (Jena), 1 - 506 (1927)
- PASCHER, A.: Über eine farblose einzellige Volvocale etc.
Beih. Bot. Zbl. I 48, 481 - 499 (1931)
- PATTEE, H.H.: Experimental Approches to the Origin of Life Problems.
Adv. Enzymology 27, 381 - 415 (1965)
- PRINGSHEIM, E.G.: Zur Physiologie saprophytischer Flagellaten (*Polytoma*, *Astasia* und *Chilomonas*).
Beitr. Allg. Bot. 2, 88 - 137 (1921)
- PRINGSHEIM, E.G.: Beiträge zur Physiologie saprophytischer Algen und Flagellaten II, *Polytoma* und *Polytomella*.
Planta 26, 565 - 591 (1937)

- PRINGSHEIM, E.G.: Über Zuckerflagellaten.
Naturwiss. 41, 380 - 381 (1954)
- PRINGSHEIM, E.G.: Die Apoplastidie bei *Euglena gracilis*.
Rev. Algol. 1, 41 - 56 (1958)
- PRINGSHEIM, E.G.: Farblose Algen.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1963)
- PRINGSHEIM, E.G. und F. MAINX: Untersuchungen an *Polytoma uvella* EHRBG., insbesondere über Beziehungen zwischen chemotaktischer Reizwirkung und chemischer Konstitution.
Planta 1, 583 - 623 (1926)
- PRINGSHEIM, E.G. und K. ONDRACEK: Untersuchung über die Geschlechtvorgänge bei *Polytoma*.
Beih. Bot. Zbl. I, 59, 118 - 172 (1939)
- PROVASOLI, L., S.H. HUTNER and A. SCHATZ: Streptomycin induced chlorophyll-less races of *Euglena*.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 69, 279 - 282 (1948)
- RANNEBERG, H.: Genetische Untersuchungen bei *Chlamydomonas reinhardtii*.
Dissertation, Universität Erlangen-Nürnberg (1968)
- RAWSON, J.R., E.J. CROUSE and E. STUTZ: The integrity of the 25-S ribosomal RNA from *Euglena gracilis* 87-S ribosomes.
Biochim. Biophys. Acta 246, 507 - 516 (1971)
- REICH, E. and D.J.L. LUCK: Replication and inheritance of mitochondrial DNA.
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 55, 1600 - 1608 (1966)
- RICHTER, G. und H. SENGER: Extraktion und chromatographische Auftrennung der Nukleinsäuren aus Photosynthese - Organismen.
Biochim. Biophys. Acta 87, 502 - 505 (1964)
- RIS, H. and W. PLAUT: Ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplast of *Chlamydomonas*.
J. Cell Biol. 13, 383 - 391 (1962)

- RITENOUR, G.L., K.W. JOY, J. BUNNING and R.H. HAGEMAN:
Intracellular localization of nitrate reductase,
nitrite reductase and glutamic acid dehydrogenase
in green leaf tissue.
Plant Physiol. 42, 233 - 237 (1967)
- RODGERS, A.: The exchange properties of magnesium in
Escherichia coli ribosomes.
Biochem. J. 90, 548 - 555 (1964)
- SAGER, R. and M.G. HAMILTON: Cytoplasmic and chloroplast
ribosomes of Chlamydomonas: Ultracentrifugal
characterization.
Science 157, 709 - 711 (1967)
- SALEMA, R. and N.P. BADENHUIZEN: Nucleic acids in plastids and
starch formation.
Acta Bot. Neerl. 18, 203 - 215 (1969)
- SCOTT, N.S. and R.M. SMILLIE: Evidence for the direction of
chloroplast ribosomal RNA synthesis by chloroplast DNA.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 598 - 603 (1967)
- SEBALD, W., G.D. BIRKMAYER, A.J. SCHWAB and H. WEISS:
Incorporation of amino acids into electrophoretic
and chromatographic fractions of mitochondrial
membrane proteins.
In: Autonomy and biogenesis of mitochondria and
chloroplasts, p. 339 - 345,
Ed. BOARDMAN, N.K., A.W. LINNANE and R.M. SMILLIE,
North-Holland Publ., Amsterdam (1971)
- SHUMWAY, L.K. and T.E. WEIER: The chloroplast structure of
Ioja maize.
Amer. J. Bot. 54, 773 - 780 (1967)
- SIEREVAG, R. and R.P. LEVINE: Fatty acid synthetase from
Chlamydomonas reinhardtii, sites of transcription and
translation.
J. Biol. Chem. 247, 2586 - 2591 (1971)
- SIERSMA, P.W. and K.S. CHIANG: Conservation and degradation
of cytoplasmic and chloroplast ribosomes in
Chlamydomonas reinhardtii.
J. Mol. Biol. 58, 167 - 185 (1971)

- SOROKIN, C. and R.W. KRAUSS: The effects of light intensity on the growth rates of green algae.
Plant. Physiol. 33, 109 - 113 (1958)
- SPREY, B.: Beiträge zur makromolekularen Organisation der Plastiden II. (Zur Verbreitung von DNA in Plastiden)
Z. Pflanzenphysiol. 54, 386 - 394 (1966)
- SPREY, B.: Ribosomale RNA und Thylakoidmembranen in Plastiden von Chlorophylldefektmutanten der Gerste.
Z. Pflanzenphysiol. 67, 223 - 243 (1972)
- SURZYCKI, S.J.: Genetic functions of the chloroplast of Chlamydomonas reinhardi: Effect of Rifampicin on chloroplast DNA-dependent RNA Polymerase.
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 63, 1327 - 1334 (1969)
- SUYAMA, Y. and W.D. BONNER: DNA from plant mitochondria.
Plant Physiol. 41, 383 - 388 (1966)
- SWIFT, H.: Nucleic acids of mitochondria and chloroplasts.
Amer. Naturalist 99, 201 - 227 (1965)
- SCHILDKRAUT, C.L., J. MARMUR and P. DOTY: Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in CsCl.
J. Mol. Biol. 4, 430 - 443 (1962)
- SCHNEIDER, A.: Beiträge zur Naturgeschichte der Infusorien.
Müllers Arch. Anat. Physiol., 191 - 204 (1854)
- SCHÖTZ, F., H. BARTHELT, C.G. ARNOLD und O. SCHIMMER: Die Architektur und Organisation der Chlamydomonas-Zelle. Ergebnisse der Elektronenmikroskopie von Serienschnitten und der daraus resultierenden dreidimensionalen Rekonstruktion.
Protoplasma 75, 229 - 254 (1972)
- SCHRAMM, G., H. GRÖTSCH und W. PELLMANN: Nicht-enzymatische Synthese von Polysacchariden, Nucleosiden und Nucleinsäuren und die Entstehung selbst-vermehrungsfähiger Systeme.
Angew. Chemie 74, 53 - 59 (1962)

- SCHUIT, K.E., N.G. ADVADHANI and D.E. BUETOW: Analysis of the RNA of *Euglena gracilis* on polyamide gels.
Arch. Mikrobiol. 71, 79 - 88 (1970)
- STREHLOW, K.: Über die Sexualität einiger Volvocales.
Z. Bot. 21, 625 - 692 (1929)
- STUTZ, E. and H. NOLL: Characterization of cytoplasmic and chloroplast polysomes in plants: Evidence for three classes of ribosomal RNA in nature.
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 57, 774 - 781 (1967)
- STUTZ, E. and J.R. RAWSON: Separation and characterization of *Euglena gracilis* chloroplast single-strand DNA.
Biochim. Biophys. Acta 209, 16 - 23 (1970)
- TASHIRO, Y. and P. SIEKEVITZ: Ultracentrifugal studies on the dissociation of hepatic ribosomes.
J. Mol. Biol. 11, 149 - 165 (1965)
- TEWARI, K.K., W. VÖTSCH, H.R. MAHLER and B. MACKLER: Biochemical correlates of respiratory deficiency. VI. Mitochondrial DNA.
J. Mol. Biol. 20, 453 - 481 (1966)
- TEWARI, K.K. and S.G. WILDMAN: Function of chloroplast DNA.
I. Hybridization studies involving nuclear and chloroplast DNA with RNA from cytoplasmic (80 S) and chloroplast (70 S) ribosomes.
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 59, 569 - 576 (1968)
- VEDEL, F. and M.J. D'AOUST: Polyacrylamid gel analysis of high molecular weight. Ribonucleic acid from etiolated and green cucumber cotyledones.
Plant. Physiol. 46, 81 - 85 (1970)
- VOLKONSKY, M.: Les variations du plaste de *Polytoma uvella*.
Compt. rend. Soc. Biol. 105, 680 - 684 (1930)
- WELLER, D.L. and J. HOROWITZ: A 30-S ribonucleoprotein particle derived from 50-S ribosomes of *Escherichia coli*.
Biochim. Biophys. Acta. 87, 361 - 364 (1964)

- WILDMAN, S.G.: An approach towards ascertaining the function of chloroplast DNA in tobacco plants.
In: Autonomy and biogenesis of mitochondria and chloroplasts, p. 402 - 412
Ed.: BOARDMAN, N.K., A.W. LINNANE and R.M. SMILLIE;
North-Holland, Publ., Amsterdam (1971)
- WINTERSBERGER, E. and G. VIEHHAUSER: Function of mitochondrial DNA in yeast.
Nature (Lond.) 220, 699 - 702 (1968)
- WINTERSBERGER, E. and U. WINTERSBERGER: Rifamycin insensitivity of RNA synthesis in yeast.
FEBS Letters 6, 58 - 60 (1970)
- WOOD, D.D. and D.J.C. LUCK: Hybridization of mitochondrial ribosomal RNA.
J. Mol. Biol. 41, 211 - 224 (1969)
- WOODCOCK, D.L.F. and L. BOGORAD: On the extraction and characterization of ribosomal RNA from Acetabularia.
Biochim. Biophys. Acta. 224, 639 - 643 (1970)
- YU, R., R. POULSON and P.R. STEWART: Comparative studies on mitochondrial development in yeast. I. Mitochondrial ribosomes from Candida parapsilosis.
Mol. Gen. Genetics 114, 325 - 338 (1972)

Herrn Professor Dr. C. G. Arnold danke ich herzlich für die Anregung zu dieser Arbeit und sein stetes Interesse an ihrem Fortgang. Für die Einführung in die Methoden der Ribosomenisolation und Elektrophorese bin ich Herrn Dozenten Dr. G. Galling und Herrn Dr. V. Ssymank (Pflanzenphysiol. Instit., Göttingen) sehr verbunden. Meinem Kollegen W. Behn bin ich für die Unterstützung bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen sehr dankbar. Frau D. Raymond und Fräulein A. Godt sei für die ausgezeichnete technische Assistenz gedankt.

Lebenslauf

Günther Georg S c h e r b e l

- 1945, am 4. April in Sulzbach-Rosenberg, als Sohn
des Obermedizinalrates Dr. med. Oskar
Scherbel und seiner Ehefrau Anna Elise, geb.
Sperber, geboren
- 1951 - 1956 Besuch der Volksschule in Sulzbach-Rosenberg
und Erlangen
- 1956 - 1965 an der Oberrealschule in Gaibach/Schweinfurt
- 1965 - 1967 Apothekerpraktikant in der Apotheke der Kli-
nischen Universitätsanstalten und Hof-Apothe-
ke, Erlangen
- 1967 - 1970 Studium der Pharmazie an der Universität
Erlangen-Nürnberg
- Aug. 1970 Pharmazeutisches Staatsexamen
- Seit Sept. 1970 zunächst als wissenschaftliche Hilfskraft,
ab 1. 3. 1971 als wissenschaftlicher Assi-
stent (Verwalter) am Botanischen Institut
der Universität Erlangen-Nürnberg,
Anfertigung einer Dissertation
- Seit 1969 verheiratet

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990